



**Estudio de la actividad de un extracto de cálices de
Physalis peruviana sobre estrés oxidativo en
roedores con diabetes mellitus tipo II**

Ivonne Helena Valderrama Parra

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Área Curricular de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
Junio de 2023

**Estudio de la actividad de un extracto de cálices de
Physalis peruviana sobre estrés oxidativo en
roedores con diabetes mellitus tipo II**

Ivonne Helena Valderrama P

Médica Veterinaria

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Luis Fernando Ospina Giraldo

Químico Farmacéutico., MSc., PhD.

Departamento de Farmacia

Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Geison Modesti Costa

Farmacéutico., MSc., PhD.

Departamento de Química

Pontificia Universidad Javeriana

Línea de Investigación:

Farmacología

Grupo de Investigación Principios Bioactivos en Plantas Medicinales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Área Curricular de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

Junio de 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.



Ivonne Helena Valderrama Parra

Fecha 30/06/2023

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme fuerzas y poner en mi camino tantas personas maravillosas sin quienes esto no hubiese sido posible.

A mi hija Ángela quien energiza mis días y quien me brindó su comprensión en tantos momentos ausentes.

A mi madre y mi hermano quienes siempre me ha brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos y me ha impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas aún frente a las adversidades.

A aquellos que ya no están pero que inspiraron este camino de academia y superación, Padre, Ivan; mi infinita gratitud por todo el amor y el aprendizaje.

A mis amigos de laboratorio y de vida: María Isabel, Sandra Echeverry, Diana Rey, Aldemar Gordillo, Sandra Cetina, Carlos Vásquez, Michelle Sepúlveda. Gracias por Ser y por siempre darme su apoyo.

A la Universidad Nacional de Colombia, el departamento de Farmacia y especialmente a los docentes que me guiaron y me animaron siempre.

A la Universidade do Vale do Itajaí -UNIVALI (Santa Catarina-Brasil) por la oportunidad de realizar mi pasantía en sus laboratorios y contar con todos sus aportes.

A la profe Marcela por su disposición siempre, su gestión y sus increíbles aportes.

A los profesores Luis Fernando y Geison Modesti por sus contribuciones, correcciones y disponibilidad siempre.

A los profesores José Roberto Santín, Nara Lins Meira y Fellippe Wolff quienes enriquecieron académica y personalmente mi experiencia en la UNIVALI

A Ana Rocha quien me brindó su mano amiga y familiar en Brasil, siempre aportando desde su conocimiento y servicio

A los grupos de investigación Principios Bioactivos en Plantas Medicinales y Grupo de Investigación Translacional en Farmacología y Toxicología FARMATOX (Brasil).

Gracias a todos por sumarse con tanto entusiasmo a esta maravillosa propuesta de hacer ciencia.

Resumen

Estudio de la actividad de un extracto de cálices de *Physalis peruviana* sobre estrés oxidativo en roedores con diabetes mellitus tipo II

Se ha demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones diabéticas, siendo esta enfermedad un trastorno metabólico caracterizado principalmente por obesidad, hiperglucemia, perfil lipídico alterado, estrés oxidativo y compromiso vascular. *Physalis peruviana* es una planta utilizada en la medicina tradicional colombiana por sus conocidas actividades como regulador de la glucosa.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antidiabética de un extracto estandarizado de *P. peruviana* y sus fracciones (en Acetato de Etilo, Butanol y Acuosa).

Después de diferentes ensayos de detección, se seleccionó la F_{Bu}OH (fracción butanólica) por sus efectos promisorios para pasar a la siguiente etapa del estudio en ensayos crónicos *in vivo* en dos biomodelos; uno fue un modelo de diabetes inducida por una dieta High Fat Diet/Streptozotocin (HFD/STZ) en ratones CD-1 y el segundo fue el modelo de síndrome metabólico inducido por la administración de fructosa en agua de bebida, en ratones CD-1. La F_{Bu}OH resultó útil para regular la glucosa en sangre, así como el índice de resistencia a la insulina. Además, el perfil lipídico mostró una mejora en comparación con el grupo no tratado y la dosis de 100 mg/kg demostrando mayor protección contra el estrés oxidativo (niveles de catalasa, superóxido dismutasa y malondialdehído). El análisis histopatológico en varios tejidos evidenció preservación de la estructura pancreática, hepática y renal en la mayoría de los animales tratados. La fracción butanólica de *Physalis peruviana* a 100 mg/kg

mostró resultados beneficiosos en cuanto disminuir la hiperglucemia, hiperlipidemia, el estado de estrés oxidativo y el inflamatorio. En experimentos *in vivo* la fracción butanólica moduló la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-6 e TNF- α en hígado de animales con síndrome metabólico, así como en el modelo de células RAW 264.7, demostrando además en este modelo celular protección frente a la formación de nitritos.

La fracción butanólica mejoró el estatus diabético por disminución del estrés oxidativo y las complicaciones adyacentes, por lo que podría considerarse beneficioso como coadyuvante en la terapia de la diabetes mellitus.

Palabras clave: Flavonoide, rutina, polifenoles, antioxidante, perfil lipídico, hiperglicemia, síndrome metabólico, *Physalis peruviana*

Abstract

Study of the activity of an extract of *Physalis peruviana* calyxes on oxidative stress in rodents with type II diabetes mellitus

It has been shown that oxidative stress plays an important role in the development of diabetic complications, being this disease, a metabolic disorder characterized mainly by obesity, hyperglycemia, altered lipid profile, oxidative stress, and vascular compromise. *Physalis peruviana* is a plant used in traditional Colombian medicine for its known activities as glucose regulation.

This study aimed to evaluate the antidiabetic activity of a standardized extract from *P. peruviana* and its fraction (FAcEt, FBuOH, and H₂O).

After different detection tests, and checking the promising effects from the fractions, FBuOH (the butanolic fraction) was selected for its promising effects, to continue to the next stage of the study in chronic *in vivo* in two biomodels; one is a model of diabetes induced by a High Fat Diet/Streptozotocin (HFD/STZ) diet in CD-1 mice and the second was the model of metabolic syndrome induced by the administration of fructose in drinking water, in CD-1 mice. The FBuOH is exhibited to regulate the blood glucose and insulin resistance index. Also, the lipid profile exhibited improvement compared to the non-treated group, and the dose of 100 mg/kg demonstrated major protection against oxidative stress (catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde levels). Histopathological in several tissues evidenced structure preservation of most of the animals treated. The butanol fraction from *Physalis peruviana* at 100 mg/kg improved hyperglycemia, hyperlipidemia, oxidative stress, and inflammatory outcome. In *in vivo* experiments, the butanolic fraction modulated the expression of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in the liver of animals with metabolic syndrome, as well as

in the RAW 264.7 cell model, also demonstrating in this cell model protection against the formation of nitrites.

The butanolic fraction improved diabetic status by reducing oxidative stress and related complications, so it could be considered beneficial as an adjuvant in diabetes mellitus therapy.

Keywords: Flavonoid, rutin, polyphenols, antioxidant, lipid profile, hyperglycemia, metabolic syndrome, *Physalis peruviana*.

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas.....	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
Objetivos	3
1. Marco teórico y generalidades	4
1.1 Diabetes mellitus: Aspectos fisiopatológicos y terapéuticos	4
1.2 Diagnóstico de diabetes mellitus tipo II	4
1.3 Estado del arte.....	8
1.3.1 Fitoterapia de la diabetes mellitus	8
1.3.2 Modelos experimentales para diabetes mellitus	9
1.3. Química y farmacología de <i>Physalis peruviana</i>	11
1.4. Tratamiento de la diabetes mellitus.....	19
2. Capítulo: Obtención de los extractos y fracciones de cálices de <i>Physalis peruviana</i> y experimentos de screening para la selección del extracto con actividad antidiabética más promisorio.....	21
2.1. Equipos y reactivos.....	22
2.2. Metodología.....	23
2.2.1. Obtención del extracto hidroalcohólico.....	23
2.2.2. Obtención de las fracciones a partir del extracto estandarizado de cálices de <i>Physalis peruviana</i>	24
2.2.3. Cromatografía en capa delgada (CCD).....	25
2.3. Experimentos de screening para la selección de los extractos con actividad promisorio.....	26
2.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH	26
2.3.2. Actividad del extracto de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> sobre la reacción de Fenton inducida en homogenado de órganos.....	27
2.3.3. Peroxidación lipídica inducida por FeSO ₄ en plasma.....	28

2.3.4. Formación de dienos conjugados inducidos con CuSO ₄ en Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	29
2.3.4.1. Aislamiento de LDL.....	29
2.2.4.4.2. Formación de Dienos	30
2.3.4.5. Actividad sobre carbohidrasas intestinales	31
2.3.4.5.1. Actividad sobre α -amilasa	31
2.3.4.5.2. Actividad sobre α -glucosidasa	32
2.3.4.6. Determinación de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) en el modelo de albúmina bovina	32
2.3.4.7. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto hipoglicemiante en ratas normoglicémicas	33
2.4. Análisis estadístico.....	34
2.5. Resultados y discusión	34
2.5.1. Análisis cualitativo del extracto y las fracciones de <i>Physalis peruviana</i> por cromatografía en capa delgada (CCD)	34
2.5.2. Actividad captadora de DPPH.....	37
2.5.3. Reacción de Fenton inducida en homogenado de órganos	39
2.5.4. Dienos conjugados (CD) en LDL.....	42
2.5.5. Peroxidación lipídica inducida en plasma por CuSO ₄	44
2.5.6. Actividad inhibitoria sobre carbohidrasas intestinales	45
2.5.6.1. Inhibición de α -amilasa	45
2.5.6.2. Inhibición de α -glucosidasa	47
2.5.7. Determinación de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) en el modelo de albúmina bovina	48
2.7. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto hipoglicemiante en modelos de hiperglicemia transitoria.....	50
2.7.1. Efecto de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> en el modelo de sobrecarga oral de glucosa.....	50
2.7.2. Efecto de los extractos de cálices de <i>Physalis peruviana</i> en el modelo de sobrecarga oral de almidón	51
2.8. Conclusiones.....	53
3. Capítulo: Composición química de la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i>	54
3.1. Equipos y reactivos	54
3.2. Metodología	55
3.2.1. Fenoles totales	55
3.2.2. Análisis de perfilado metabólico.....	55
3.3. Resultados y discusión	58
3.3.1. Fenoles totales	58
3.3.2. Análisis de Perfilado Metabólico	60
3.4. Conclusiones.....	63
4. Capítulo: Efecto de la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> en un modelo de diabetes por consumo de dieta alta en grasas y administración de STZ a dosis bajas repetidas.....	64
4.1 Equipos y reactivos.....	65
4.2 Animales.....	65
4.3 Inducción del modelo diabético	66

4.4	Evaluación de indicadores de estrés oxidativo <i>post mortem</i>	67
4.5	Análisis estadístico	68
4.6	Resultados y discusión.....	68
4.6.1	Efecto de la FBuOH sobre la evolución del peso de ratones diabéticos	68
4.6.2	Efecto de la FBuOH sobre los NGS de ratones diabéticos	70
4.6.3	Efecto de la FBuOH sobre el perfil lipídico de ratones diabéticos	71
4.6.4	Efecto de la FBuOH sobre NGS durante una sobrecarga oral de glucosa (SOG) en ratones diabéticos	73
4.6.5	Efecto de la FBuOH sobre el índice de resistencia a insulina (HOMA-IR) en los ratones diabéticos.....	74
4.6.6	Efecto de la FBuOH sobre parámetros de estrés oxidativo (catalasa, peroxidación lipídica (MDA) y superóxido dismutasa) en los ratones diabéticos post tratamientos.....	76
4.7	Histopatología del páncreas, hígado y riñón de ratones diabéticos tratados con FBuOH	78
4.7.1	Páncreas	78
4.7.2	Hígado.....	80
4.7.3	Riñón	81
4.8	Conclusiones	82
5.	Capítulo: Efecto de la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> en un modelo de síndrome metabólico (SM) inducido por consumo de fructosa a bajas dosis	83
5.1	Equipos y reactivos	84
5.2	Animales	84
5.3	Inducción al modelo de síndrome metabólico.....	84
5.4	Análisis estadístico	85
5.5	Resultados y discusión.....	86
5.5.1	Efecto de la FBuOH sobre el consumo de agua, alimento y ganancia de peso en ratones con Síndrome Metabólico.....	86
5.5.2	Efecto de la FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre de en ratones con Síndrome Metabólico.....	88
5.5.3	Efecto de la FBuOH durante una sobrecarga oral de glucosa (SOG) en ratones con Síndrome Metabólico.....	89
5.5.4	Efecto de la FBuOH sobre el perfil lipídico en ratones con Síndrome Metabólico.....	90
5.5.5	Efecto de la FBuOH sobre el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratones con Síndrome Metabólico.....	92
5.5.6	Histopatología de adipocitos, hígado y páncreas de ratones con síndrome metabólico tratados con FBuOH	94
5.7.	Conclusiones	95
5.	Capítulo: Posibles mecanismos de acción de la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i>.....	96
5.1.	Equipos y reactivos	97
5.2.	Aislamiento de lípidos hepáticos	97
5.3.	Determinación de TNF- α e IL-6 en homogenado de hígado y células RAW 264.7	98
5.4.	Cultivo de células RAW 264.7	98

5.5. Determinación viabilidad celular en RAW 264.7 por la técnica de reducción de sal de tetrazolio (MTT).....	98
5.6. Determinación de nitritos en células RAW 264.7.....	99
5.7. Resultados y discusión	100
5.7.1. Efecto de la FBuOH sobre niveles de colesterol y triglicéridos en lípidos hepáticos de ratones con Síndrome Metabólico	100
5.7.2. Efecto de la FBuOH sobre TNF- α e IL-6 en homogenado de hígado de ratones con Síndrome Metabólico	101
5.7.3. Efecto de la FBuOH sobre TNF- α , IL-6 y NO $_2$ \cdot en macrófagos RAW 264.7	104
5.7.4. Efecto de la FBuOH sobre la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7	106
5.8. Conclusiones.....	107
6. Conclusiones y recomendaciones.....	109
7.1. Conclusiones.....	109
7.2. Recomendaciones.....	110
Reconocimientos	110
Bibliografía.....	113

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1. Elaboración del extracto hidroalcohólico de cálices de <i>P. peruviana</i>	24
Figura 2-2. Esquema de la elaboración de las fracciones a partir del extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i>	25
Figura 2-3. CCD revelada con sulfato cérico amónico.....	35
Figura 2-4. CCD revelada con Vainillina.	36
Figura 2-5. CCD revelada con reactivo NP/PEG y luz UV.	36
Figura 2-6. Actividad inhibitoria de las fracciones y el extracto etanólico de cálices de <i>Physalis peruviana</i> sobre alfa amilasa.....	46
Figura 2-7. Actividad inhibitoria de las fracciones y el extracto etanólico de cálices de <i>Physalis peruviana</i> sobre alfa glucosidasa.....	47
Figura 2-8. Efecto protector del extracto de <i>Physalis peruviana</i> y sus fracciones sobre la formación de AGEs a concentraciones entre 1 a 800 µg/mL.	49
Figura 2-9. Actividad hipoglicemiente del extracto y fracciones de <i>Physalis peruviana</i> en un modelo de sobrecarga oral de glucosa en ratas Wistar.	50
Figura 2-10. Actividad hipoglicemiente del extracto y fracciones de <i>Physalis peruviana</i> en un modelo de sobrecarga oral de almidón en ratas Wistar.	52
Figura 3-1. Curva de calibración de AG para cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	58
Figura 3-2. Cromatograma de la FBuOH de cálices de <i>Physalis peruviana</i>	61
Figura 4-1. Efecto de FBuOH sobre el peso corporal en ratones diabéticos.....	69
Figura 4-2. Efecto de la FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos.....	70
Figura 4-3. Efecto de la FBuOH sobre el perfil lipídico de ratones diabéticos.....	72
Figura 4-4. Efecto de la FBuOH durante una sobrecarga oral de glucosa en ratones diabéticos.....	73
Figura 4-5. Efecto de FBuOH sobre parámetros de estrés oxidativo en ratones diabéticos.....	77
Figura 4-6. Efecto de FBuOH sobre islotes pancreáticos en ratones diabéticos tratados con FBuOH a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg.	79
Figura 4-7. Efecto de FBuOH sobre tejido hepático de ratones diabéticos.	80
Figura 4-8. Efecto de FBuOH sobre tejido renal de ratones diabéticos.....	81

Figura 5-1. Efecto de FBuOH sobre el consumo de agua, consumo de alimento y ganancia de peso en ratones con síndrome metabólico.....	86
Figura 5-2. Efecto de la FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones con Síndrome Metabólico.....	88
Figura 5-3. Efecto de FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones con Síndrome Metabólico, sometidos a sobrecarga oral de glucosa (SOG).....	89
Figura 5-4. Efecto de la FBuOH sobre el perfil lipídico de ratones diabéticos.	90
Figura 5-5. Metabolismo hepático de la fructosa.....	91
Figura 5-6. Efecto de la FBuOH sobre adipocitos, hígado y páncreas.	94
Figura 6-1. Efecto de la FBuOH sobre lípidos hepáticos de ratones con síndrome metabólico.....	100
Figura 6-2. Efecto de FBuOH sobre TNF- α en homogenado de hígado de ratones con Síndrome Metabólico.....	101
Figura 6-3. Efecto de FBuOH sobre IL-6 en homogenado de hígado de ratones con SM.	102
Figura 6-4. Participación de mecanismos inflamatorios en hiperglicemia crónica....	103
Figura 6-5. Efecto de FBuOH a diferentes concentraciones sobre la producción de TNF- α en células RAW 264.7.	104
Figura 6-6. Efecto de FBuOH a diferentes concentraciones sobre la producción de IL-6 en células RAW 264.7.....	105
Figura 6-7. Efecto de FBuOH a diferentes concentraciones sobre la producción de NO ₂ · en células RAW 264.7.....	105
Figura 6-8. Efecto de FBuOH a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular por el método MTT en células RAW 264.7.....	106

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Factores de riesgo en DMT II.....	6
Tabla 1-2. Composición química de <i>Physalis peruviana</i> reportada en la literatura ...	13
Tabla 2-1. Rendimientos de cada una de las fracciones obtenidas	35
Tabla 2-2. Captación de radicales DPPH por el extracto total y la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i>	39
Tabla 2-3. IC ₅₀ del extracto y las fracciones de <i>Physalis peruviana</i> en peroxidación lipídica inducida por FeSO ₄	40
Tabla 2-4. IC ₅₀ del extracto y fracciones en la formación de dienos conjugados.....	43
Tabla 2-5. IC ₅₀ del extracto y fracciones en peroxidación lipídica en plasma	44
Tabla 3-1. Condiciones de gradiente de concentración de la fase móvil.....	57
Tabla 3-2: Parámetros de medida en espectrometría de masa	57
Tabla 3-3. Fenoles totales del extracto de cálices de <i>Physalis peruviana</i> y la fracción butanólica.....	59
Tabla 3-4. Compuestos identificados en la FBUOH a través del método de dereplicación	60
Tabla 3-5. Flavonoides y fitoprostanos presentes en la FBUOH, reportados por LC/MS	62
Tabla 3-6. Compuestos fenólicos presentes en la FBUOH, reportados por LC/MS	62
Tabla 4-1. Efectos de FBUOH sobre algunos parámetros clínicos para determinar resistencia a insulina en ratones diabéticos.....	75
Tabla 5-1. Efectos de FBUOH sobre algunos parámetros clínicos para determinar resistencia a insulina en ratones con Síndrome Metabólico	92

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
α	Alfa (enzima alfa amilasa, alfa ramnosidasa)
β	Beta (células beta pancreáticas, enzimas beta glucosidasa)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
λ_{\max}	Longitud de onda de máxima absorbancia
m/z	Relación masa / carga

Unidades de medida

Unidad	Término
dL	Decilitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mg	Miligramo
kg	Kilogramo
nm	Nanómetro
μ M	Micromolar
μ g	Microgramo
μ L	Microlitro

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AC	Adenilato ciclasa
ACC1	Acetil-CoA carboxilasa 1
ACL	ATP-citrato liasa
ACN	Acetonitrilo
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AGEs	Advanced glycation end products (Productos finales de glicación avanzada)
AGS	Ácido graso sintasa
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP

ANOVA	Análisis de varianza
Apo B	Apolipoproteína B-100
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATC	Ácido tricarboxílico
ATP	Adenosín Trifosfato
BSA	Bovine serum albumine (Albumina sérica bovina)
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
Canales de K^{+}_{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
Canales de KCa	Canales de potasio activados por calcio
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
CFT	Contenido de flavonoides totales
CMC	Carboximetilcelulosa
CPT-1	Carnitina O-palmitoil transferasa 1
CT	Colesterol total
DAD	Detector de arreglo de diodos
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT I	Diabetes mellitus tipo 1
DMT II	Diabetes mellitus tipo II
DPP IV	Dipeptidil peptidasa IV
E.E.M	Error estándar de la media
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
FOXO1	Proteína de caja de cabeza de horquilla O1
GLP-1	Péptido 1 similar al glucagón
GLUT	Transportadores de glucosa
H&E	Hematoxilina y eosina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico).
HFD	High Fat Diet-Dieta rica en grasas
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IP3	Inositol trifosfato
IRS-1	Sustrato 1 del receptor de insulina
KRb	Buffer de Krebs Ringer – bicarbonate
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LDL	Low-density lipoprotein – Lipoproteína de baja densidad

MAPK	Vías de proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehído
MKK7	Proteína quinasa 7 activada por mitógeno
MTTP	Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos
NGS	Niveles de glucosa en sangre
NZO	Ratón obeso de Nueva Zelanda
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFK-6	Fosfoquinasa-6
PGC-1 β	Coactivador 1 β del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ
Pi	Fosfato inorgánico
PKC ϵ	Tipo proteína quinasa C ϵ
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PP2A	Proteína fosfatasa 2a
pSer-IRS-1	Serina fosforilada IRS-1
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
SReBP-1c	proteína de unión al elemento regulador de esteroides-1c
STZ	Estreptozotocina
UV	Ultravioleta

Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica en la cual el páncreas produce cantidades de insulina deficientes para alcanzar a regular los niveles de glucosa en la sangre, o bien cuando, aunque produzca cantidades esperadas, esta insulina no puede ser utilizada para ejecutar su función. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado alrededor de los 62 millones de personas adultas con la enfermedad en la región de las Américas y se calcula que para el año 2040 se alcanzaría un número cercano a 109 millones de personas. Es importante mencionar que a nivel mundial se evidenció un aumento de muertes prematuras por diabetes entre los años 2000 a 2016; siendo para el 2019 en las Américas la sexta causa de muerte, lo anterior se observa en incremento en zonas de más bajos recursos (OPS, 2022). Aproximadamente 63 millones de personas actualmente padecen la enfermedad en América siendo en Colombia la prevalencia aproximada del 30%, en 2021 se reportaron 1.474.567 personas diagnosticadas con diabetes y las regiones que más la presentan son Bogotá, Antioquia y Valle del Cauca. Esta enfermedad es considerada de gran importancia clínica dada la complejidad de su fisiopatología que origina, entre otros, trastornos relacionados con complicaciones cardiovasculares que pueden desencadenar desenlaces fatales. En Colombia, dada esta problemática, se han desarrollado planes gubernamentales cuyas propuestas buscan minimizar las cifras de diabetes mediante el control de la obesidad, en busca de reducir las complicaciones y la mortalidad prematura por la enfermedad. Entre las medidas a tener en cuenta está el diagnóstico temprano y el control de la alimentación, peso y estilo de vida (Ministerio de Salud y Protección social, 2022).

En la actualidad, se han estudiado plantas con propiedades antidiabéticas tanto en humanos enfermos como en animales con diabetes experimental tipo II (Huang et al., 2017). En países subdesarrollados, las fuentes terapéuticas naturales han sido muy utilizadas y son estos usos tradicionales a lo largo del tiempo un indicio para el desarrollo de fármacos. Hacia 1989 Bailey y Day, reportaron a nivel mundial cerca de

400 plantas con actividad antidiabética, hacia el 2013 la cifra aumentó a 800 y en el año 2016 a 1200 (Arumugam et al., 2013; Perera, 2016). Dentro de este listado se incluye a *Physalis peruviana* perteneciente a la familia de las Solanáceas, evidenciándose la oportunidad para profundizar en el estudio detallado de los cálices de esta planta partiendo del uso tradicional conocido de sus frutos, hojas, flores y cálices en el tratamiento de otras enfermedades. Al cáliz de la uchuva también se le conoce popularmente como capacho, tiene un tamaño aproximado de 5 cm en forma de saco que está formado por cinco pétalos unidos entre sí. Durante los primeros días, este cáliz es de color verde por su alto contenido de clorofila, pero hacia el día 40, esta clorofila comienza a reducirse observándose una tonalidad más blanca. El cáliz recubre a fruto, confiriéndole protección frente a climas intensos, ataques de aves e insectos así como de algunos microorganismos (Flórez and Fischer, 2000). Teniendo en cuenta los estudios preliminares, la hipótesis a comprobar a lo largo del desarrollo de este trabajo es que el extracto etanólico de cálices de *Physalis peruviana* mejora la evolución del síndrome diabético en un modelo de diabetes experimental.

El uso terapéutico que se conoce de las diferentes partes de la planta de *Physalis peruviana* pone en evidencia efectos prometedores hacia el manejo coadyuvante de la diabetes mellitus, así como la oportunidad a la hora de centrarse en el estudio detallado de los cálices, siendo estos productos de desecho postcosecha que bien, podría aprovecharse como terapéutico.

Por esta razón, este trabajo pretende aportar información relevante de los cálices en biomodelos que permitan extrapolar el efecto en la salud humana.

Objetivos

Objetivo general:

Estudiar el efecto de un extracto de cálices de *Physalis peruviana* sobre estrés oxidativo en roedores de laboratorio con diabetes mellitus tipo II, inducida por la administración de una dieta alta en grasas y estreptozotocina a dosis bajas.

Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto hipoglicemiante del extracto y/o las fracciones de cálices de *Physalis peruviana* en roedores con diabetes mellitus tipo II, inducida por la administración de una dieta alta en grasas y estreptozotocina a dosis bajas.
2. Evaluar el efecto antioxidante del extracto y/o las fracciones de cálices de *Physalis peruviana*.
3. Identificar compuestos que contribuyan a la actividad antioxidante o hipoglicemiante presentes en el extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana*.
4. Identificar posibles mecanismos de acción hipoglicemiante o antioxidante de las fracciones y/o los compuestos activos de un extracto de cálices de *Physalis peruviana*

1. Marco teórico y generalidades

1.1 Diabetes mellitus: Aspectos fisiopatológicos y terapéuticos

Las células beta-pancreáticas están encargadas de producir insulina para regular los niveles de glucosa en sangre (NGS) sin embargo, en el caso de la diabetes mellitus tipo I (DMTI), cuando estas células son atacadas por el sistema inmune sufren una destrucción masiva y no hay producción de la hormona por lo que el paciente dependerá de por vida de insulina exógena. En otro caso, el de la diabetes mellitus tipo II, aunque las células β producen insulina en cantidades suficientes, esta hormona no puede ser utilizada por el organismo para realizar la respectiva homeostasis de glucosa (American Diabetes Association, 2014). La DMTH se caracteriza por hiperglicemia sostenida, estrés oxidativo y daño en algunas lipoproteínas asociado a desórdenes vasculares como arteriosclerosis (Kong y Nimmo, 1997).

1.2 Diagnóstico de diabetes mellitus tipo II

Existen varios desórdenes en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas que están implicados en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo II y que desencadenan la resistencia a la insulina (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2014). En Colombia, se han establecido pruebas de tamizaje que permiten clasificar el estado de riesgo de un individuo de padecer la enfermedad. Uno de los más utilizados es el llamado *findrisk* que está compuesto por ocho preguntas con respuestas múltiples. Aquellos pacientes con puntajes ≥ 12 serán sometidos a prueba de glicemia en ayuno para corroborar su estatus (Tankova et al., 2011).

La diabetes mellitus (DM) presenta un cuadro clínico que se caracteriza principalmente por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglicemia) debido a varios factores que pueden ser la deficiencia en los niveles de insulina por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas o también, a pesar de que estas células estén en óptimo funcionamiento, resistencia por parte de los receptores hacia la captación de insulina y como resultado no se produce la regulación de los niveles de glicemia. Generalmente los pacientes diabéticos presentan con la evolución de la enfermedad ambas anormalidades. De acuerdo con la World Health Organization (OMS) la diabetes mellitus (DM) se puede clasificar en:

- TIPO I: aquella en la que se destruyen los islotes pancreáticos y las células β pancreáticas por procesos autoinmunes (linfocitos T) por lo que no hay producción de insulina (Kurien et al., 2006).
- TIPO II: en este tipo se tiene poca producción de insulina, así como resistencia de los receptores de esta. Es muy compleja y se considera que es de origen multifactorial (Panunti et al., 2004; Stumvoll et al., 2005).

Existen síntomas comunes en la DM como son poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, problemas de visión por retinopatía diabética, pie diabético. Por ello se habla de un síndrome entendido como un estado patológico asociado a síntomas etiológicos inespecíficos (Stanley, 1995) que trae consigo una serie de procesos relacionados con trastornos en las vías metabólicas de polioles, formación de productos de glicación avanzada (AGES) y el aumento del estrés oxidativo por la glucoxidación y autooxidación de las moléculas de glucosa, lo que conlleva a complicaciones vasculares (Lisset et al., 2013). Por otra parte, el estrés oxidativo es considerado como la pérdida del balance entre las sustancias pro y antioxidantes del organismo aumentándose de esta forma la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs) exhibido en signos patológicos (Gastell and De Alejo, 2000). Tras este interés, se han desarrollado estudios previos acerca del aislamiento de diferentes antioxidantes a partir de plantas y su administración como una alternativa terapéutica que coadyuva en el tratamiento de la DM (Lockwood, 2005).

6 Estudio de la actividad de un extracto de cálices de *Physalis peruviana* sobre estrés oxidativo en roedores con diabetes mellitus tipo II

Tabla 1-1. Factores de riesgo en DMT II

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE DMT II	PLASMA O SUERO VENOSO	SINTOMAS	PRE-DIABETES
Glicemia en ayuno	>126mg/dL	Pérdida de peso, poliuria, polidipsia, cansancio, visión borrosa, infecciones o heridas frecuentes de difícil curación, hormigueo o endurecimiento de manos o pies	100-125 mg/dL
SOG (glicemia de 2 horas)	≥200mg/dL		
Prueba de tolerancia oral a glucosa	≥200mg/dL		140-199 mg/dL
Hemoglobina glicosilada HbA1C	≥ 6.5%		5.7% - 6,4%

Fuente:(American Diabetes Association, 2019)

Aunque la fisiopatología que acompaña a la DM aún no está completamente entendida, se ha demostrado que la sobreproducción de radicales superóxido a nivel mitocondrial y endotelial conllevan diferentes complicaciones sistémicas. Con el aumento de estos radicales se activan diferentes vías como la vía de polioles, de proteínas quinasas C (PKC), aumento en la expresión de productos finales de glicación avanzada (AGEs) e incremento en la actividad de la vía de las hexosas complicando la patogénesis de la diabetes por la inactivación de importantes enzimas como prostaciclina sintasas y óxido nítrico sintasa. Estas últimas que originalmente se activarían como mecanismos para contrarrestar la presencia de alteraciones vasculares como esclerosis al inactivarse perpetúan las vías proinflamatorias en respuesta a la isquemia por defectos en la angiogénesis (Giacco and Brownlee, 2010). Este proceso inflamatorio es caracterizado por una fase de respuesta aguda asociada a la enfermedad metabólica en la que se manifiesta la presencia de citoquinas en respuesta a estrés oxidativo agudo o crónico (Black, 2003). Patel & Santani en el 2009 estudiaron la relación entre NF-KB (Factor Nuclear kappa beta) con la fisiopatología de la diabetes evidenciando a través de ensayos en modelos experimentales que al ser modulado este factor se podrían disminuir los efectos colaterales vasculares relacionados con el cuadro diabético (Patel and Santani, 2009). Adicionalmente, en otros estudios realizados en

hepatocitos primarios humanos se ha conocido el efecto inhibitorio sobre el factor NF- κ B de la metformina así como el efecto de éste fármaco sobre la expresión de algunas interleuquinas (Cameron et al., 2016).

Aunque se busca realizar un control de la DMT II a través de cambios de estilos de vida junto con el uso de fármacos que actúen como coadyuvantes en la optimización de la regulación de la glucosa, en ocasiones la producción de insulina a nivel pancreático disminuye progresivamente tanto que se hace necesaria la utilización de análogos de insulina; sin embargo, se requiere una utilización y una dosificación cuidadosa para evitar riesgos de hipoglicemias severas (Cryer, 2016).

Existen varios tipos de insulina que se indican de acuerdo con el comportamiento glicémico de cada paciente, estos análogos son clasificados de acuerdo con la Asociación Americana de la Diabetes en:

- INSULINA DE RÁPIDA ACCIÓN: alcanza su pico de máximo efecto a la hora y tiene una duración entre 2 a 4 horas comenzando a actuar a partir de los 15 minutos de su administración (Insulina glulisina, insulina lispro e insulina aspart).
- INSULINA DE CORTA ACCIÓN O REGULAR: alcanza su pico de máximo efecto a las 2 a 3 horas y tiene una duración de 3 a 6 horas comenzando a actuar a los 30 minutos después de su administración (insulina humana).
- INSULINA DE ACCIÓN INTERMEDIA: tiene una duración aproximada de 24 horas comenzando a actuar varias horas después de su administración (NPH Porcina).

1.3 Estado del arte

1.3.1 Fitoterapia de la diabetes mellitus

Dados los efectos secundarios que se observan con la utilización de fármacos alopáticos como por ejemplo la acidosis láctica, hipoglicemias severas, alteraciones vasculares entre otros, se mantiene activa la investigación de nuevos productos naturales que sean efectivos y que minimicen estos efectos indeseados. Tradicionalmente, la medicina popular utiliza plantas solas o combinadas como tratamientos para la diabetes y son foco de investigaciones detalladas alrededor del mundo.

Entre las plantas más conocidas a nivel mundial que presentan efecto hipoglicemiante, algunas ya cuentan con estudios *in vivo* e *in vivo* que confirman su eficacia. Sin embargo, en cuanto a su utilidad clínica las evidencias no son tan amplias. *Gymnema sylvestre* (no tiene nombres comunes en español), es por ejemplo, una planta en la que se ha demostrado su utilidad para controlar la glicemia y los niveles de lípidos y hemoglobina glicosilada (HbA1c) en pacientes con diabetes mellitus tipo I tratados junto con insulinoterapia (Shanmugasundaram et al., 1990), así mismo se demostró su actividad insulinogoga en islotes pancreáticos aislados (Al-Romaiyan et al., 2010). Por otra parte, *Momordica charantia* (melón amargo, calabaza amarga, cundeamor chino, balsamina o tomaco) ha demostrado mejorar los niveles de glicemia y colesterol así como mejoría tras complicaciones secundarias de la diabetes como cardiopatía y retinopatía diabética (Fuangchan et al., 2011). El ginseng *Panax ginseng*, *Panax japonicus* en pacientes con diabetes mellitus tipo II, redujo el peso corporal así como los niveles de glicemia y HbA1c. *Silybum marianum* conocida como cardo mariano presenta varios beneficios en especial en la regulación de desórdenes hepáticos, como disminución de la resistencia a la insulina así como descenso en los niveles de colesterol, LDL, glucosa y transaminasas hepáticas, por lo que se considera ideal como coadyuvante en el tratamiento de diabetes mellitus tipo II (Hussain, 2007).

En Colombia, Ospina & Pinzón en el año 1995 presentaron un listado de las plantas con efecto antidiabético reportado y aunque muchas de éstas solamente se conocen sus

beneficios por su uso tradicional, algunas de ellas cuentan con estudios previos basados en ensayos sobre modelos animales normoglicémicos sometidos a sobrecarga de carbohidratos, animales diabéticos por estreptozotocina o aloxano, captación de glucosa en músculo estriado, producción de insulina en células pancreáticas aisladas entre otros, como batería de ensayos no solo para confirmar la actividad terapéutica de las mismas sino también, para descartar su toxicidad y tener un indicio acerca de posibles mecanismos de acción. Se menciona por ejemplo, la utilización de algunas plantas de la familia Solanácea como *Brunfelsia grandiflora* conocida popularmente como Chirigüey y cuya raíz y corteza se ha utilizado por su efecto hipoglicemiante, y de la misma familia, *Physalis peruviana* de la que se conoce su actividad en diabetes y otras enfermedades por el alto contenido de polifenoles en sus frutos y cuya relevancia terapéutica es atribuida a esta característica (Jurado Teixeira et al., 2016).

1.3.2 Modelos experimentales para diabetes mellitus

El modelo más utilizado para el estudio de posibles antidiabéticos en animales de laboratorio es el de la administración parenteral de estreptozotocina (STZ) en ratas y ratones y en segundo lugar por aloxano para la inducción química en ratones, ratas, perros y conejos (Sharma et al., 2013). La STZ ingresa a las células β a través de los transportadores GLUT-2 causando modificaciones en el DNA (alquilación) y necrosis celular al producir poliribosilación y liberación masiva de óxido nítrico (NO). De acuerdo con la dosificación de STZ se puede conseguir desarrollo de DMT 1 o DMT II. En el caso del aloxano, este se utiliza para inducir al desarrollo de DMT I y actúa produciendo necrosis de las células β del páncreas, su administración también se realiza vía parenteral (Antia et al., 2005).

Existen varios biomodelos que buscan imitar la fisiopatología de la DMT II y existe mucha controversia sobre todo con respecto al modelo de STZ por asemejarse más a la DMT I por la ausencia en la producción de insulina causada debido al daño masivo en los islotes pancreáticos, pero sin la manifestación de otras complicaciones metabólicas

marcadas de la enfermedad. En la actualidad, se han caracterizado modelos que buscan inducir DMT II, combinando la administración de dietas con alto contenido en grasas y carbohidratos y la administración de dosis bajas de STZ, de esta manera, se induce obesidad y alteraciones del perfil lipídico, daño parcial de las células β pancreáticas, resistencia a insulina, estrés oxidativo y demás alteraciones metabólicas de la DMT II (Zhang et al., 2008).

Otro modelo utilizado principalmente en ratas, perros, primates y cerdos es el quirúrgico en el que se puede realizar una lesión hipotalámica media que va a desencadenar resistencia a la insulina en músculo, esta técnica quirúrgica también se ha realizado extirpando el páncreas. Estos métodos quirúrgicos no son tan utilizados en la actualidad, pues se consideran poco prácticos en cuanto a procedimiento, cuidados y complicaciones posquirúrgicas (Carvalho et al., 2003).

Los modelos análogos se utilizan con regularidad y permiten el desarrollo de la enfermedad de manera espontánea inducidos por una condición (obesidad) y son una ventaja a la hora de probar sustancias naturales porque se deja a un lado el sesgo de la influencia que pudo tener en el ensayo el inductor químico. Un ejemplo de estos es la rata Goto-Kakizaki (GK), el ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO), el ratón KK, *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena) y la rata OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rat). Por último, los modelos genéticamente modificados a través de diferentes mutaciones permiten la manifestación de características deseadas, resultan hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos como es el caso del ratón db/db (diabético homocigoto). La rata Zucker fa/fa (obesa homocigota) presenta degeneración de células β , e hipoinsulinemia sin embargo, se utilizan más para estudios de la fisiopatología de las enfermedades que para ver los efectos de fármacos (Arias Díaz and Balibrea, 2007).

Para estudios *in vivo* se suelen manejar las líneas celulares secretoras de insulina, glucagón y somatostatina, usadas para el estudio de funciones celulares principalmente

como algunos cultivos de adipocitos para estudiar la captación de glucosa y las vías de resistencia a la insulina, adicionalmente, para estudios del efecto de productos naturales en la captación de glucosa también se han utilizado células que sobre expresan al transportador GLUT-4 (Sharma et al., 2013).

1.3. Química y farmacología de *Physalis peruviana*

Physalis peruviana (*P. peruviana*) se conoce tradicionalmente en Colombia con el nombre de “uchuva” o en inglés *cape gooseberry*. Corresponde a la familia de las Solanáceas y su fruto se forma y permanece dentro del cáliz. En Colombia crece a temperaturas entre 13 °C a 18 °C y en alturas entre 1500 a 3000 m. s. n. m. Es una planta silvestre autóctona del Perú aunque se ha aclimatado a otros países como Chile y Colombia (Flórez and Fischer, 2000). *P. peruviana* es una planta de uso tradicional con frutos de pesos entre 4 a 5 g color naranja-amarillo, sabor agridulce, conocida por sus efectos diuréticos, analgésicos, mejoradores de la visión, antiparasitarios y además antidiabéticos (Aristizábal, 2013). En general, el interés hacia el estudio de la actividad de *P. peruviana* en diabetes ha partido del uso tradicional y de los aportes de investigaciones que reportan los contenidos en flavonoides y también la actividad de éstos sobre los niveles de glucosa en sangre y así como sobre el estrés oxidativo presente en la enfermedad (Lock O et al., 2016). En este sentido, los flavonoides se consideran agentes antidiabéticos de alta potencia ya que ejercen acciones hipoglicemiantes (acción insulinomimética) y a la vez antidiabéticas (secretagogo de insulina), (Cazarolli et al., 2008) por lo que se les atribuye la protección de las células pancreáticas por su efecto antioxidante así como la disminución de otros efectos fisiopatológicos de la diabetes como la neuropatía, la arterioesclerosis y las cataratas (Wu et al., 2005).

En el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, a través de estudios en modelos experimentales de diabetes por estreptozotocina se demostró la disminución de los niveles de glicemia y de algunos marcadores de estrés oxidativo a partir de la administración vía oral del extracto etanólico de los frutos de *P. peruviana* (Mora et al., 2010) mientras que *in vivo*, se evidenció la inhibición de algunas

carbohidrasas intestinales como uno de los modos de acción hipoglicemiante de este extracto (Rey Padilla, 2015). También existen reportes del efecto hipoglicemiante de un extracto acuoso de hojas de *P. peruviana* administrado por vía oral a cobayos sometidos a una sobrecarga oral de glucosa (Kasali et al., 2013). Para la planta completa de *P. peruviana* también se ha reportado actividad antioxidante que se observó ser potenciada según el tipo de extracto (Wu et al., 2005).

Específicamente en cuanto a los cálices de *P. peruviana*, se ha investigado la actividad hepatoprotectora, luego de administrar la fracción metanol-agua del extracto por vía oral a ratas Wistar con hepatotoxicidad inducida con tetracloruro de carbono (CCl₄) (Toro et al., 2013). En estas, después del tratamiento se observó la reducción de enzimas hepáticas ALT, AST, PA (Alanina Aminotransferasa, Aspartato Aminotransferasa y Fosfatasa Alcalina) y de marcadores de estrés oxidativo (catalasas y superóxido dismutasas). Adicionalmente, se ha reportado el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de los cálices, instilado vía rectal en ratas con colitis inducida con TNBS (Ácido Trinitrobenceno sulfónico), cuyos resultados demostraron la disminución de Interleuquina 1β (IL-1β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) (Castro et al., 2015). En un modelo de inflamación por carragenina (edema plantar) y macrófagos peritoneales inducidos con LPS (Lipopolisacárido) se encontró que la administración intraperitoneal de una fracción enriquecida en compuestos identificados (Peruviosas A y B) atenuaba la inflamación, lo que se atribuyó a la disminución de óxido nítrico y de prostaglandina E₂ (Franco et al., 2014).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación, además de los estudios de las propiedades antioxidantes de los frutos de *P. peruviana* y su importante contenido de flavonoides, se identificó el flavonoide glucosilado rutina como compuesto mayoritario del extracto de los cálices (Toro, 2014). En este mismo año, se realizó un aporte a la estandarización de la extracción de los cálices teniendo la rutina como marcador químico y terapéutico del extracto (Cardona, 2014).

Para varios autores ha sido de gran interés identificar los metabolitos activos presentes en *P. peruviana*. Como se observa en la siguiente tabla, para diferentes partes de la planta se observan moléculas con actividad antioxidante. Nótese que compuestos como los witanólidos y los flavonoides se encuentran tanto en el fruto como en los cálices.

Tabla 1-2. Composición química de *Physalis peruviana* reportada en la literatura

FRUTOS	
COMPUESTO	FUENTE
WITANÓLIDOS:	
4 β -Witanólido E	
ÉSTERES DE SUCROSA:	
5-Hidroximetil-2- Furancarboxaldehido, 3-O-isobutiril- β -D-Fructofuranosil-2-O-Decanoil-3, 4-di-Oisobutiril- α -D-6Glucopianósido, 1-O- <i>trans</i> -Cinnamoil- β -D-Glucopiranosil-(1-6)- β -D-Glucopiranososa	(Bernal and Correa, 1998)
VITAMINAS LIPOSOLUBLES:	
Provitamina A: β -caroteno, Ácido 16-hidroxioxohexadecanóico, Vitaminas del complejo B: Tiamina, Riboflavina, Niacina Vitamina E: α -tocoferol, β -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol Vitamina K ₁ : phylloquinona	(Bernal & Correa, 1998; Ramadan, 2012)
VITAMINAS HIDROSOLUBLES:	
Vitamina C: Ácido ascórbico	(Ramadan, 2011)
FENOLES (Flavonoides):	

14 Estudio de la actividad de un extracto de cálices de *Physalis peruviana* sobre estrés oxidativo en roedores con diabetes mellitus tipo II

<p>Quercetina, Miricetina, Kaempferol, Quercetina 3-O-rutinòsido, Kaempferol 3-O-rutinòsido</p>	<p>(Gironés-Vilaplana et al., 2014)</p>
<p>ÀCIDOS GRASOS:</p> <p>Ácido linoleico, Ácido gama linoleico (GLA), Ácido oleico, Ácido palmítico, Ácido palmitoleico, Triacilglicerol (TAG)</p>	<p>(Ramadan, 2012)</p>
<p>FITOESTEROLES:</p> <p>Δ^5-avenasterol, Campesterol, β-sitosterol, Lanosterol Δ^7-avenasterol, Ergosterol, Stigmasterol</p>	<p>(Ramadan & Morsel, 2003)</p>
<p>MINERALES</p>	<p>(Ramadan & Moersel, 2007)</p>
<p>MACRONUTRIENTES:</p> <p>Sodio, Potasio, Calcio, Fósforo y Magnesio.</p>	<p>(Puente et al., 2011)</p>
<p>MICRONUTRIENTES:</p> <p>Zinc y Hierro</p>	<p>(Wu et al., 2005)</p>
<p>FISALINAS “pseudoesteroides”:</p> <p>Fisalina A, Fisalina B, Fisalina D, Fisalina F</p>	
<p>ALCALOIDES:</p> <p>Calisteginas A3, B1, B2, y C1</p>	<p>(Asano et al., 1997)</p>

HOJAS	
COMPUESTO	FUENTE
<p>WITANÓLIDOS:</p> <p>Fiperunolidos A, B, C, D, Peruvianoxido, Fiperunólido E, Fiperunólido F, Visconólido, 2,3-Dihidrowitanólido E, Witanólido S, 4β-Hidroxiwitanólido E, 5β,6β-epoxi-1β,14α,17β,20-Tetrahidroxi-24- enólido, Witanólido E, Witaperuvina D, Witafisanólido</p> <p>FISALINAS:</p> <p>Fisalina A</p> <p>ÁCIDOS GRASOS:</p> <p>Ácido mirístico, Ácido palmítico, Ácido palmitoleico Ácido margárico, Ácido margaroléico, Ácido esteárico, Ácido oleico, Ácido linoleico, Ácido linoléico, Ácido eicosanoico, Ácido behénico, Ácido llinocérico</p> <p>VITAMINAS LIPOSOLUBES:</p> <p>Vitamina E: α-tocoferol, β-tocoferol, δ-tocoferol, y γ-tocoferol</p> <p>FITOESTEROLES:</p> <p>Campesterol, Estigmasterol, β-Sitosterol δ-5-Avenasterol, Avenasterol δ-5,24-Estigmastadienol δ-7-24-Metilenocolesterol, Sitosterol</p>	<p>(Lan et al., 2009) (Ramadan & Morsel, 2003; Ramadan & Moersel, 2007)</p> <p>(Bernal & Correa, 1998)</p> <p>(Chasquibol & Yacono, 2015)</p>
CÁLICES	
COMPUESTO	FUENTE
<p>WITANÓLIDOS:</p> <p>28-Hidroxiwitanólido E, 4β-Hidroxiwitanólido E, Witanólido E</p> <p>FENOLES: (Flavonoides)</p>	<p>(Dinan et al., 1997) (Franco et al., 2014) (Gironés-Vilaplana et al., 2014)</p> <p>(Toro et al., 2014) (Franco et al., 2014)</p>

16 Estudio de la actividad de un extracto de cálices de *Physalis peruviana* sobre estrés oxidativo en roedores con diabetes mellitus tipo II

<p>Rutina, Nicotiflorina, Quercetina 3-<i>O</i>-rutinósido 7-<i>O</i>-hexósido, Kaempferol 3-<i>O</i>-rutinósido, Kaempferol 3-<i>O</i>-rutinósido 7-<i>O</i>-hexósido</p> <p>ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS:</p> <p>Ácido 3-<i>O</i>-cafeoiquinico, Ácido 5-<i>O</i>-cafeoiquinico</p> <p>ESTERES DE SUCROSA:</p> <p>Peruviosa A, Peruviosa B</p>	
<p>PLANTA COMPLETA</p>	
<p>COMPUESTO</p>	<p>FUENTE</p>
<p>WITANÓLIDOS:</p> <p>Fiperunólido A (4b, 14a,20b-trihydroxi-5b,6b-epoxi-1-oxowita-2,16,24-trinenolido)</p> <p>Fiperunólido B (5a,6b, 14a,17b,20b -penta- hidroxi-1-oxowita-2,24-dienolido)</p> <p>Fiperunólido C (6b, 14a,17b,20b-tetrahidroxi-5a-cloro-1- oxowita-2,24-dienolido)</p> <p>Fiperunólido D (5a,6b, 14a,17b,20b,27-hexahidroxi-1-oxowita-2,24-dienolido)</p> <p>Fiperunolidos E, F, G</p> <p>Fisaperuvinas I, J con 7 variaciones:</p> <p>(4) 20-hidroxiwitanolido E</p> <p>(5) Witaperuvina C</p> <p>(6) Perulactona C</p> <p>(7) Perulactona</p> <p>(8) Witaperuvina N</p> <p>(9) Fiperunólido B</p> <p>(10) Fiperunólido E</p> <p>ALCALOIDES:</p> <p>Higrina</p> <p>WITAESTEROIDES:</p> <p>Fisalinas, Witaperuvina, Witaperuvina F Witaperuvina G</p>	<p>(Lan et al., 2009)</p> <p>(Sang-Ngern et al., 2016)</p> <p>(Bernal & Correa, 1998)</p>

El estrés oxidativo es considerado como la pérdida del balance entre las sustancias pro y antioxidantes del organismo lo que permite que las especies reactivas de oxígeno

(EROs) aumenten, exhibiendo signos patológicos (Castell & Pérez, 2000). Tras este interés, se han desarrollado estudios previos acerca del aislamiento de diferentes antioxidantes a partir de plantas y su administración como una alternativa terapéutica que coadyuva en el tratamiento de la DM (Schultz *et al.*, 2005).

Aunque la fisiopatología que acompaña a la DM aún no está completamente entendida, se ha demostrado que la sobreproducción de radical superóxido a nivel mitocondrial y en células endoteliales causa alteraciones de tipo cardiovascular entre otras. Se considera que la hiperglicemia crónica es la primera condición que induce al aumento de EROs por sobreestimulación de cadena de transporte de electrones y por lo tanto un aumento excesivo de peróxido de hidrógeno el cual se elimina gracias a la acción de la catalasa (CAT), sin embargo se cree que el daño en esta enzima antioxidante da paso a la activación de ciertas vías responsables de las complicaciones en la fisiopatología de esta enfermedad (Wiernsperger, 2003). Normalmente, la activación del sistema antioxidante contrarrestaría la presencia de alteraciones vasculares, sin embargo, cuando estas complicaciones secundarias están presentes las vías proinflamatorias se aumentarán en respuesta a la isquemia por defectos en la angiogénesis (Giacco & Brownlee, 2010; Black, 2003). Puntualmente, sobre células beta pancreáticas, se ha comprobado que la cadena transportadora de electrones así como la actividad de la enzima NOX (NADPH oxidasa) son fuentes de radicales libres, principalmente aniones superóxido (O_2^-), así mismo cuando se tiene un cuadro de hiperglicemia persistente, durante la alternancia en la toma de diferentes vías moleculares, se aumenta la presencia de radicales libres tras la activación de las proteínas quinasas así como el aumento de calcio a nivel del citosol (Alam *et al.*, 2022).

Por otra parte, en presencia de EROs, las células beta pancreáticas no consiguen desarrollar a cabalidad su función principal que es la de producir insulina para regular los niveles de glucosa en la sangre (Abdelhameed *et al.*, 2021). Adicionalmente, procesos apoptóticos inminentes son activados disminuyéndose cada vez más el número de células pancreáticas viables (Yaribeygi *et al.*, 2020). Estudios realizados en ratas con DM inducida por STZ y tratadas con el jugo de *P. peruviana* y orujo al 10% demostraron normalización de los niveles de glicemia, perfil lipídico y se demostró la normalización

de actividad antioxidante endógena (CAT, SOD) así como la atenuación de los niveles de TBARs en tejido pancreático. Los autores atribuyeron los efectos benéficos al contenido de polifenoles, flavonoides y vitamina C tanto en el jugo como en el orujo (Darwish et al., 2020).

Por otra parte, se ha demostrado que pacientes con obesidad tienen un alto riesgo de padecer diabetes mellitus generándose un síndrome de resistencia a insulina que se caracteriza por presentar signos como: alteraciones en el perfil lipídico con aumento marcado en los niveles de colesterol LDL y TG, así como disminución de colesterol HDL; en estos pacientes también se observa hipertensión arterial y una característica adicional de este síndrome es que, junto con el cuadro de dislipidemia, un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias, así como marcadores de estrés oxidativo elevados son evidenciados (Rodríguez et al., 2017). Estudios demostraron que pacientes obesos presentaron una importante carbonilación de proteínas inducidas por EROs y al identificar las mismas se demostró que estas sufrieron varias modificaciones postranscripcionales entre estas: oxidaciones, nitrosilaciones, carbonilaciones y peroxidaciones. Los mismos autores reportaron la carbonilación en gran medida de GLUT 4 así como modificaciones asociadas a peroxidación lipídica. De esta forma se afirma la influencia del estrés oxidativo sobre la funcionalidad proteica y la degradación selectiva de las mismas (Boden et al., 2017). Otros marcadores de inflamación como NF- κ B (Factor Nuclear Kappa Beta) también ha demostrado su activación dentro de la fisiopatología de la diabetes y se ha evidenciado a través de ensayos en modelos experimentales que al ser modulado se podrían disminuir los efectos colaterales vasculares relacionados con el cuadro diabético (Patel and Santani, 2009). Cabe resaltar que estudios adicionales realizados en hepatocitos primarios humanos probaron el efecto inhibitorio sobre el factor NF- κ B de la metformina como uno de los fármacos más utilizados para el manejo del síndrome metabólico mostrando además su efecto sobre la modulación en la expresión de algunas interleuquinas (Cameron *et al.*, 2016).

1.4. Tratamiento de la diabetes mellitus

Dado que la diabetes tipo 2 es una enfermedad que cursa con el deterioro funcional de las células beta del páncreas, bien sea por la resistencia a esta hormona o por la deficiente producción de esta, los tratamientos se han venido diseñando con la intención de retrasar el incremento progresivo de la falla, así como la disminución en la resistencia de los receptores a la unión con la insulina (Buchanan *et al.*, 2002). Uno de los aspectos a tener en cuenta para la optimización de cualquiera de los tratamientos está relacionado con la modificación de estilos de vida como parte del control de los desórdenes metabólicos, así como medida preventiva en la diabetes mellitus (Reyes *et al.*, 2016).

El mercado cuenta con fármacos que ayudan a disminuir la hiperglicemia, cuyo mecanismo de acción es aumentar la secreción de insulina, por ejemplo, la familia de las sulfonilureas de primera generación (tolbutamida y clorpropamida) y de segunda generación (glibenclamida, glicazida, glipizida, glimepirida). También se emplean fármacos como las biguanidas (metformina) y las tiazolidinedionas (pioglitazona, rosiglitazona) cuyo mecanismo de acción es mejorar la respuesta de las células a la insulina, disminuyendo la resistencia a esta hormona. Los fármacos que impiden la absorción de glucosa desde el intestino por inhibición enzimática de alfa-glucosidasa como el miglitol y la acarbosa y finalmente, fármacos que actúan produciendo inhibición del glucagón en condiciones de hiperglicemia aumentando a su vez la secreción de insulina. Este efecto es producido a través de tres mecanismos: los análogos de la amilina (pramlintida), aquellos que inhiben de enzima Dipeptidil peptidasa IV (iDPP4) (sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, vildagliptina), aquellos fármacos que son agonistas del receptor “glucagon-like peptide I” o GLP1 (liraglutida, exenatida), aquellos que inhiben los cotransportadores 1 y 2 de sodio-glucosa en los túbulos renales (iSGLT1 e iSGLT2) y por último los fármacos análogos de insulina (Reyes *et al.*, 2016).

Aunque se busca realizar un control de la DMT II a través de cambios de estilos de vida y uso de fármacos coadyuvantes en la regulación de la glucosa, en ocasiones la producción de insulina a nivel pancreático disminuye progresivamente y se hace

necesaria la utilización de análogos de la hormona, éstos requieren una utilización cuidadosa para evitar riesgos de hipoglicemias severas (Zammit & Frier, 2005).

Para el control glicémico, la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE) han diseñado una guía para el tratamiento del paciente con DMT II, jerarquizando el uso de fármacos de acuerdo con la sintomatología. Esto con el fin de prevenir los efectos secundarios que a largo plazo se presentan dado el curso crónico de la enfermedad, así como también para evitar riesgos de hipoglicemias severas.

2. Capítulo: Obtención de los extractos y fracciones de cálices de *Physalis peruviana* y experimentos de screening para la selección del extracto con actividad antidiabética más promisorio

Como se planteó anteriormente, el uso tradicional de *Physalis peruviana* viene relacionando con el efecto antidiabético de los frutos sobre diferentes enfermedades (Toro et al., 2014), entre estas la diabetes mellitus. Partiendo de esta información, así como de diferentes estudios adelantados en los diferentes órganos de la planta, se puede relacionar el contenido de diferentes compuestos como flavonoides y polifenoles en la contribución de éstos para el tratamiento coadyuvante de este síndrome. En el caso de los cálices, se plantea un especial interés al ser un subproducto que, de acuerdo con estudios adelantados por el grupo de investigación de la Universidad Nacional de Colombia, demuestran también contener compuestos promisorios. Puntualmente, a sabiendas del importante contenido del flavonoide rutina en los cálices, se procedió a profundizar en la posible acción promisorio de las diferentes fracciones evaluando a través de diferentes experimentos preliminares la posible actividad antioxidante, anti-glicación, así como su actividad inhibitoria sobre algunas carbohidrasas intestinales (α -amilasa y α -glucosidasa).

La información obtenida en esta parte del estudio permitió seleccionar el extracto más promisorio, identificar algunos compuestos presentes en este y pasar a las siguientes fases experimentales sobre modelos *in vivo* e *in vivo* que se aproximaban a la patogénesis en humanos.

2.1. Equipos y reactivos

Rotavapor Büchi R-114, R-110, percolador, liofilizador (Labconco®) solventes calidad HPLC: Metanol (HPLC) de J.T Baker®, Agua de calidad CLAE obtenida a través del sistema MilliQ de Millipore Co®, equipo de filtración al vacío, concentrador al vacío CentriVap Benchtop (Labconco®), ácido acético, acetato de etilo, diclorometano, *n*-butanol, todos grado reactivo; sílica gel 60, vainillina sulfúrica y sulfato cérico amónico, Placas para cromatografía en capa delgada, en soporte de aluminio, Merck®; NP/PEG (Difenilboriloxietilamina / 5% etanol, polietilenglicol-4000).

El material vegetal fue colectado en el municipio de Granada-Cundinamarca (Colombia), ubicación 04° 31'1"Norte, 74°21'0" Oeste, altitud: 2243 m.s.n.m., temperatura promedio: máxima 21 °C/mínima 10 °C, fecha de recolección: octubre de 2018, humedad relativa a la fecha de recolección: 80%. Un ejemplar comprobante se almacenó en el Herbario Nacional Colombiano (COL 512200), número de contrato MADS 249 de 2019 y el material vegetal fue identificado por el taxónomo Parra C.

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratas Wistar, machos de mínimo 7 semanas de edad y pesos entre 160-210 g. Los animales fueron distribuidos en grupos de 8 individuos. Los animales fueron mantenidos a temperatura ambiente cercana a los 21 °C ± 2 con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y el alimento fue retirado 8 horas antes de los experimentos. Se utilizó pentobarbital sódico como anestésico previo a la decapitación con guillotina. Los experimentos fueron previamente aprobados por el comité de ética de la Facultad de Ciencias a través del acta 07/2014.

Las muestras de sangre fueron colectadas de una de las venas caudales y los niveles de glucosa en sangre fueron medidos con un glucómetro Accu-Check Performa®.

Para los experimentos screening se utilizó: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (1898-66-4), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), FeSO₄, CuSO₄, H₂O₂, *p*-nitrofenil α -D-glucopiranosido (pNPG) (N1377), Almidón Azul Sigma (S7776), Acarbosa (A8980), enzima obtenida de polvo intestinal de rata (en acetona) (I1630) y alfa amilasa de páncreas porcino (PPA) A3176) fueron obtenidos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); membranas para filtración 0,22 μm (CNW Technologies) y filtros para diálisis (Amicon® Ultra, Ultra cell-50k, Millipore, USA). Lector de placas BERTHOLD®, ultracentrífuga Thermo Fisher Scientific® rotor 1H641, microcentrífuga (Hermle Z216, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen).

2.2. Metodología

2.2.1. Obtención del extracto hidroalcohólico

Este método fue propuesto previamente en el grupo de investigación con la finalidad de obtener un extracto con altos contenidos del flavonoide rutina también reportado por el mismo grupo como marcador analítico del extracto al ser el flavonoide de mayor concentración en el extracto hidroalcohólico, condición que fue favorecida por la polaridad del etanol al 70% utilizado en esta extracción (Cardona et al., 2017; Toro & Aragón, 2014). De acuerdo con la metodología estandarizada por Cardona (2017), una vez obtenido el material pulverizado (Figura 2-1), se tomaron 30 g y se humectaron con 120 mL de etanol al 70% para luego colocar en un percolador al que se le adicionaron 150 mL más del etanol al 70%. Se realizó el recambio del solvente cada 24 horas por tres días. Al final el extracto hidroalcohólico fue concentrado por presión reducida en un rotavapor Büchi R-114, R-110 (Cardona et al., 2017).

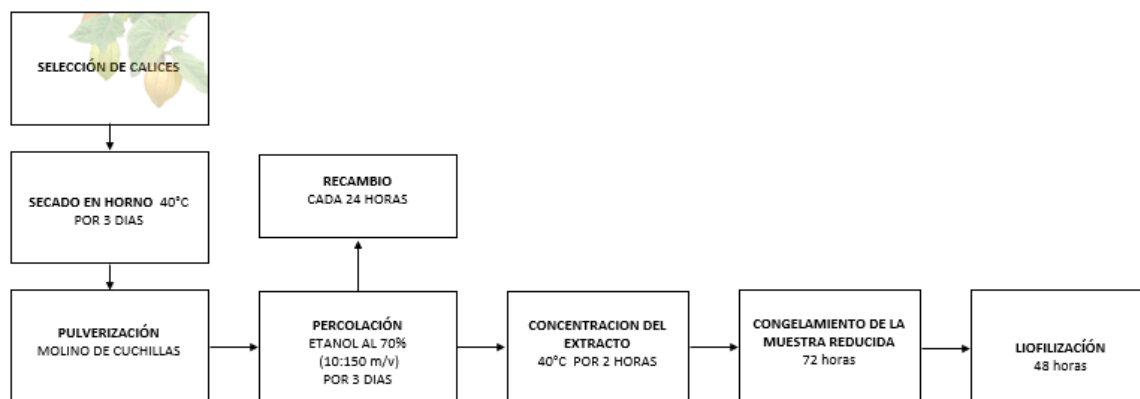


Figura 2-1. Elaboración del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana*.

Luego de la liofilización del extracto, se procedió a realizar sellado de las muestras y a almacenarlas en cámara de desecación al vacío para evitar que las muestras se hidrataran con la humedad ambiental.

2.2.2. Obtención de las fracciones a partir del extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana*

Con el objetivo de obtener diferentes grupos de compuestos del extracto, se realizó el fraccionamiento de éste, utilizando una cromatografía al vacío y varios solventes de menor a mayor polaridad (diclorometano, acetato de etilo, butanol), seguido de lavado con agua y agua acidificada, generando las respectivas fracciones orgánicas (FDCM, FAcEt, FBuOH) y fracciones acuosas (FH₂O, FH₂Oác), siendo estas últimas, agrupadas (Costa, 2013) (Figura 2-2).

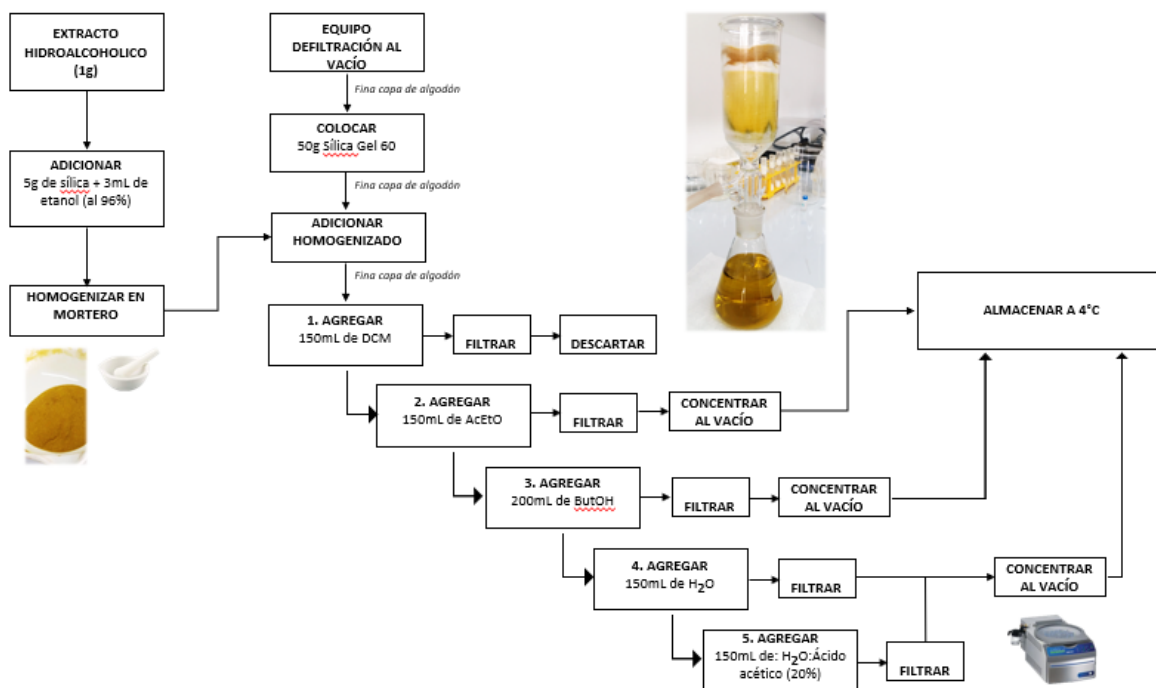


Figura 2-2. Esquema de la elaboración de las fracciones a partir del extracto de cálices de *Physalis peruviana*.

AcEtO: Acetato de Etilo; BuOH: Butanol DCM: Diclorometano; H₂O: Agua

2.2.3. Cromatografía en capa delgada (CCD)

La cromatografía en capa delgada es una técnica frecuentemente utilizada por ser uno de los métodos más sencillos para determinar de manera cualitativa la presencia de compuestos en una muestra. Se pesaron 10 mg de cada muestra y se disolvieron en 3 mL de metanol, posteriormente las muestras fueron sembradas en 3 placas de sílica de 7x7 cm. Aparte, se prepararon 15 mL de la fase móvil que contenía una mezcla en la siguiente proporción de solventes: AcEtO/MeOH/H₂O (38,3:4,5:3,3). La fase móvil se colocó en una cámara cromatográfica y una vez saturada, cada placa fue colocada dentro. Como reveladores se utilizaron: reactivo vainillina, sulfato cérico amónico y NP/PEG y finalmente, se midió el R_f de cada una de las manchas observadas.

En cuanto a los porcentajes de rendimiento, este cálculo se llevó a cabo dentro de una contribución al estudio de la caracterización química del extracto de cálices de

P. peruviana y sus fracciones, dentro del desarrollo de una tesis de pregrado del grupo Tecprona (Mahecha, 2017). El porcentaje de rendimiento se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{g de extracto hidroalcohólico}}{\text{g de material vegetal}} * 100$$

2.3. Experimentos de screening para la selección de los extractos con actividad promisorio

2.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH

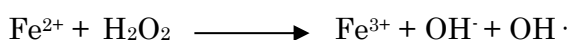
Este método se basa en la reducción del radical DPPH· a DPPH₂ en presencia de un antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno. Siendo el DPPH· de color violeta, durante la reacción de reducción se torna amarillo, y los cambios en su absorbancia se leen a 515 nm (Brand et al., 1995).

Las muestras se prepararon por triplicado, diluidas en metanol y en concentraciones finales de 14, 28, 42, 56 y 70 µg/mL. En una placa de 96 pozos se colocaron 70 µL de cada muestra y se adicionaron 30 µL de DPPH· a una concentración final de 33 µg/mL. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico a una concentración de 40 µg/mL y como control negativo metanol y DPPH. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos y la absorbancia fue leída a 515 nm.

2.3.2. Actividad del extracto de los cálices de *Physalis peruviana* sobre la reacción de Fenton inducida en homogenado de órganos

Este método permitió estimar formación de peroxidación lipídica a través de la formación de *TBARs* (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) como propuso Ohkawa et al., 1979 e inducir a la reacción de Fenton como lo propone Pai Kotabagilu y colaboradores (2014), con algunas modificaciones.

El metal en estado ferroso (Fe^{2+}) es el agente más prooxidante, acelera la reacción que causa peroxidación lipídica ya que el peróxido de hidrógeno, así como los hidrógenos son convertidos en radicales libres así:



Para realizar la primera parte de este experimento se utilizaron tubos Falcon de 15 mL y se colocaron los reactivos de la siguiente manera:

- 100 μL de proteína equivalentes a 5 mg (cuantificada previamente por el método de Ácido bicinconínico (BCA))
- 500 μL del extracto y fracciones a concentraciones iniciales de: 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/mL
- 500 μL de PBS (0,01 M, pH 7,4)
- 500 μL de FeSO_4 (20 mM)
- 250 μL de H_2O_2 (20 mM)

El volumen final de esta parte de la reacción fue de 1,3 mL y las muestras fueron mezcladas con vórtex y luego incubadas a 50 °C por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada muestra:

- 1mL de ácido tricloroacético al 10 % (TCA)
- 1mL de ácido tiobarbitúrico al 0,67 % (TBA)

Nuevamente las muestras se sometieron a incubación durante 30 minutos a 100 °C y fueron sumergidas en una cubeta de hielo. Terminado este tiempo, se adicionó 3 mL de n-butanol a cada tubo y nuevamente los tubos se agitaron con vórtex. 200 µL del sobrenadante fueron tomados y colocados en una microplaca de 96 pozos la cual fue leída a 532 nm (Modificado de Pai et al., 2014). Las muestras fueron preparadas por triplicado, adicionalmente se sembró una muestra considerada como blanco que estaba constituida por homogenado, solución tamponada, TCA y TBA y otra muestra control en la que se colocó ácido gálico a una concentración 1mM (Pai Kotebagilu et al., 2014).

2.3.3. Peroxidación lipídica inducida por FeSO₄ en plasma

Dentro del organismo, se generan continuamente especies reactivas del oxígeno, (EROs), como el radical superóxido ($O_2\cdot$), dentro de estos podemos mencionar al radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos, causan diversos daños oxidativos a proteínas, lípidos y ADN, conduciendo a varias alteraciones en la funcionalidad y a diversas enfermedades. Los quelantes de hierro actúan como antirradicalarios, eliminando estas EROs y reduciendo la cantidad de hierro disponible (Adjimani and Asare, 2015). De esta forma se disminuye la cantidad del radical $\cdot OH$ producto de las reacciones de Fenton. Este experimento se llevó a cabo para evaluar el comportamiento quelante o antioxidante de las fracciones y el extracto de *P. peruviana*, frente a la producción de radicales hidroxilo.

Sangre fresca de ratas sin ayuno previo fue recolectada en tubos con EDTA y centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos. El plasma fue separado y congelado en tubos de microcentrifugación hasta el momento del ensayo. La inducción de la reacción se realizó en un volumen final de 350 µL. Se preparó una dilución de plasma en buffer PBS a 0.01 M y a pH 7,4 (1:4) y se colocaron 250 µL de la solución en un microtubo. Se prepararon diluciones del extracto y/o las fracciones calculando concentraciones finales

de 25, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ y de cada una de estas se agregaron 50 μL . Finalmente, se adicionaron 50 μL de FeSO_4 a una concentración final de 100 μM . Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 6 horas (Pai Kotebagilu et al., 2014).

La cuantificación de sustancias que reaccionan con TBA fue realizado mediante el ensayo propuesto por Ravi et al., 2004. Para este, se adicionó a la mezcla anterior 1mL de TCA al 10 % y se centrifugó durante 10 minutos a 1850g a 4 C, luego se tomaron 500 μL del sobrenadante y se adicionaron 500 μL de TBA al 0,67 %. Esta mezcla se llevó a calentamiento a 96 °C durante 30 minutos para finalmente colocar los microtubos en baño de hielo durante 10 minutos y leer la absorbancia de cada muestra a 535 nm.

Cada muestra se realizó por triplicado con sus respectivos blancos, los cuales no contenían el agente prooxidante. Adicionalmente, se realizó una muestra utilizando un compuesto con actividad antioxidante conocida como control positivo (ácido gálico 100 μM) y un control negativo que contenía PBS en lugar de antioxidante en el cual se consideró que contenía el 100 % de la reacción de oxidación.

2.3.4. Formación de dienos conjugados inducidos con CuSO_4 en Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

2.3.4.1. Aislamiento de LDL

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Dos Santos y colaboradores con algunas modificaciones. Sangre fresca de individuos sin ayuno previo fue recolectada en tubos con EDTA y centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos. La densidad del plasma fue ajustada (1,21 g/mL) adicionando KBr sólido (0,325 g/mL de plasma), posterior a esto se adicionaron 6.6 mL de una solución de buffer fosfato (NaCl 110 mM, EDTA 1mM, 20 mM fosfato dibásico de potasio) a pH 7.4. Las muestras fueron colocadas en tubos para ultracentrífuga Thermo Fisher Scientific® rotor 1H641 y se programó el procedimiento de centrifugación a 200.000g con aceleración lenta y desaceleración durante 12 horas. Una vez pasado este tiempo se obtuvieron muestras de plasma con diferentes capas de lípidos separadas de acuerdo con su densidad. A

partir de esto, las LDL ubicadas en la capa superior fueron tomadas para iniciar el procedimiento (Dos Santos et al., 2018). Finalmente, las muestras fueron dializadas utilizando ultrafiltración; para esto se utilizaron tubos Millipore (Amicon® Ultra, Ultra cell-50k, Millipore, USA) y se colocaron en microcentrífuga (Hermle Z216, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen) por 30 minutos a 10700g. Finalmente, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de membrana de 0,22µm para luego almacenarse a -80 °C para posteriores experimentos.

La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al., 1951).

2.2.4.4.2. Formación de Dienes

Se considera que todo aquello que contenga ácidos grasos polinsaturados puede utilizarse como sustrato para la generación de dienos conjugados, la elección de utilizar LDL se debe a la relación que hay *in vivo* con la fisiopatología de la inflamación y algunas enfermedades subsecuentes a diabetes como la aterosclerosis. Las LDL tienen 4 características conformacionales ideales para la oxidación: contiene moléculas de triacil-glicerol las cuales están constituidas por lípidos insaturados, colesterol bien sea libre o esterificado, proteína Apo B y lípidos insaturados que se encuentran unidos a la superficie fosfolipídica (Laguerre et al., 2007). La formación de dienos conjugados se da durante la formación de hidroperóxidos y es medible a longitudes de onda entre 230 y 235 nm.

Una vez aisladas las LDL, primero se realizó la cuantificación de proteínas siguiendo el método de Lowry (Lowry et al., 1951) y seguido a esto se utilizó el método propuesto por Parthasarathy et al., 1999 para inducir el proceso de peroxidación. Para comenzar, se realizó una dilución de las LDL a una relación 1:300 con PBS a pH 7.4. El extracto y las fracciones se prepararon a una concentración final de 400, 200, 100, 50 y 25 mg/mL teniendo en cuenta un volumen final de reacción de 1 mL. En cada tubo Eppendorf, se

colocaron 900 μL de la dilución de LDL, 50 μL de cada extracto y 50 μL de CuSO_4 (50 μM). Para el blanco se colocaron 900 μL de la dilución de LDL y 100 μL de PBS y para la muestra que representa el 100% de la reacción se colocaron 900 μL de la dilución de LDL, 50 μL de PBS y 50 μL de CuSO_4 las muestras fueron almacenadas a 37 °C durante 8 horas y protegidas de la luz. Finalmente, cada muestra fue llevada a celdas de cuarzo para leer la absorbancia a 232 nm en un espectrofotómetro Shimatzu UV-1800.

2.3.4.5. Actividad sobre carbohidrasas intestinales

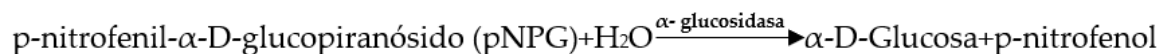
2.3.4.5.1. Actividad sobre α -amilasa

El objetivo de este experimento es evaluar en presencia del extracto de *P. peruviana* y sus fracciones la actividad hidrolítica de la enzima en los enlaces 1,4 de los polisacáridos que, sin presencia de un inhibidor, los separa en moléculas como glucosa y maltosa.

En ensayo se llevó a cabo según la metodología previamente reportada por el grupo de investigación (Rey et al., 2015). Se preparó la enzima alfa amilasa (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, USA) a una concentración de 2 UI/mL en buffer Tris-HCl (0.05 M, pH 6.9). Aparte, se realizaron diluciones seriadas para para las muestras del extracto crudo de cálices de *P. peruviana*, así como de sus fracciones. El sustrato utilizado fue almidón azul el cual previamente se suspendió en el mismo buffer en una concentración de 10 mg/mL. En tubos de microcentrífuga, se colocó 200 μL del sustrato y se llevó a ebullición por 5 minutos, posteriormente se incubó a 37 °C por 5 minutos y se adicionaron 200 μL del extracto y 100 μL de la enzima para un volumen final de 300 μL . Se realizó un control de 100% de actividad enzimática el cual tenía buffer en reemplazo del inhibidor y se utilizó acarbosa (320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo. La mezcla se incubó durante 2 horas a 37 °C y luego se centrifugó a 3000 rpm. Finalmente se sirvieron 100 μL de cada sobrenadante en una microplaca de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 595 nm.

2.3.4.5.2. Actividad sobre α -glucosidasa

La actividad de α -glucosidasa se determinó a través de la siguiente reacción en la cual la liberación de *p*-nitrofenol es proporcional a las moléculas de glucosa presentes en la muestra:



El protocolo seguido fue el reportado previamente por el grupo de investigación (Rey et al., 2015). Se utilizó *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) 11.3 mM como sustrato el cual, genera un cromógeno de color amarillo en presencia de la enzima por la liberación de α -D-glucosa + *p*-nitrofenol. La enzima utilizada extraída de un extracto de liofilizado de polvo intestinal de rata en acetona, este se preparó a una concentración de 1 UI/mL y el fármaco patrón que se utilizó por su conocida actividad inhibitoria de carbohidrasas intestinales fue acarbosa a una concentración de 5 mg/mL, éste se colocó como si fuera uno de los extractos y la mezcla fue incubada durante 45 minutos a 37 °C, también se realizó un control de 100% de actividad enzimática el cual tenía buffer en reemplazo del inhibidor.

En una microplaca de 96 pozos se colocó un volumen máximo de 100 μ L por pozo de la mezcla constituida por 20 μ L buffer de fosfatos 0,5 M, 10 μ L de la enzima α -glucosidasa y 40 μ L de agua destilada y 20 μ L del inhibidor. Finalmente, se leyó la absorbancia en un lector de placas BERTHOLD® a una longitud de onda de 450 nm.

2.3.4.6. Determinación de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) en el modelo de albúmina bovina

La formación de productos de glicación avanzada es un método de fluorescencia utilizado para medir los productos de formación después de una reacción no enzimática

sucesiva. Estas reacciones incluyen los reordenamientos de Maillard y Amadori, cuyos productos tienen atributos fluorescentes (Derbré et al., 2010). FBUOH y sus fracciones se prepararon a partir una solución madre usando como solvente DMSO a concentraciones finales de 1 a 800 µg/mL. En una microplaca de 96 pozos, las muestras fueron servidas e incubadas a 37°C protegidas de la luz, 10 mg/mL de Albúmina de Suero Bovino (BSA), D-ribosa (0,5 M), y cada muestra en tampón fosfato (50 mM), NaN₃ 0,02% y pH 7,4. El volumen final fue de 100 µL por pocillo. 24 horas más tarde, la fluorescencia de AGEs se midió a λ_{exc} 370 nm y λ_{em} 440 nm (Séro et al., 2013).

2.3.4.7. Evaluación *in vivo* del efecto hipoglicemiante en ratas normoglicémicas

Los tratamientos (extracto, fracciones, sustancia patrón y vehículo) fueron administrados por vía oral (dosis máxima: 500 mg/kg de peso corporal) y una hora después se administró una sobrecarga oral de glucosa (SOG) o almidón (SOA) a dosis de 2000 mg/kg con el fin de producir una hiperglicemia transitoria y evaluar en varios periodos de tiempo los niveles de glicemia. Los NGS para el caso de la sobrecarga de almidón se midieron al tiempo 0 (momento de la sobrecarga), 60, 120 y 180 minutos después, y en el caso de sobrecarga de glucosa al tiempo 0, 60, 90 y 120 minutos. Se obtuvo una gota de sangre periférica realizando un pequeño corte en la vena caudal. Posteriormente se colocó la muestra sobre tiras reactivas y se leyó en un glucómetro comercial (Accu-Check Performa) (Modificado de Murillo et al., 2006).

Los animales se sometieron a ayuno previo durante 8 horas y se dividieron de la siguiente manera:

Grupo I: Vehículo (agua destilada)

Grupo II: Acarbosa para sobrecarga de almidón (dosis: 10 mg/kg) como fármaco de referencia de reconocida actividad antihiperglicemiante o **glibenclamida para sobrecarga de glucosa** (dosis: 200 mg/kg) como fármaco de referencia de reconocida actividad hipoglicemiante.

Grupos III: EP: Extracto hidroalcohólico de cálices de *Physalis peruviana* (dosis: 500 mg/kg)

Grupo IV: Fracción AcEt (dosis: 500 mg/kg)

Grupo V: Fracción BuOH (dosis: 500 mg/kg)

Grupo VI: Fracción H₂O (dosis: 500 mg/kg)

2.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism® versión 7.0, la homogeneidad de los datos se determinó utilizando la prueba estadística de Bartlett para ANOVA y *t-Student* para medias de resultado. Se utilizó prueba de ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Bonferroni. Para los experimentos *in vivo* se realizó ANOVA de una vía y se aplicó prueba *post hoc*. Nivel de significancia con un valor de $\alpha \leq 0,05$.

2.5. Resultados y discusión

2.5.1. Análisis cualitativo del extracto y las fracciones de *Physalis peruviana* por cromatografía en capa delgada (CCD)

Una vez liofilizado el extracto de cálices de *P. peruviana* se obtuvieron 2,87 g de extracto partiendo de 30 g iniciales de material vegetal recolectado. El porcentaje de rendimiento se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{2,87 \text{ g de extracto hidroalcohólico}}{30 \text{ g de material vegetal}} * 100 = 9,56 \%$$

Este rendimiento se encuentra por debajo de lo reportado por Cardona, esto podría explicarse por las diferencias en la época de recolecta del material vegetal en ambos trabajos (Cardona et al., 2017), esto ya que se considera que después de sembrada la

planta, se da el pico de producción 4 a 7 meses después, con una duración de 10 a 12 meses. Sin embargo, esto depende adicionalmente de factores como temperatura y humedad, entre otros (Fischer et al., 2014).

Tabla 2-1. Rendimientos de cada una de las fracciones obtenidas

Fracción	Peso (mg)	% rendimiento
F-DCM	18,0	0,9
F- AcEt	785,5	39,3
FBuOH	246,5	12,3
F-H ₂ O	216,7	10,8

Las fracciones obtenidas a partir del extracto estandarizado de los cálices de *P. peruviana* fueron: fracción diclorometano (FDCM), la cual dado su bajo rendimiento fue descartada; fracción Acetato de etilo (FACet); fracción butanólica (FBuOH); y fracción acuosa (H₂O) en la cual se reunieron la fracción H₂O y H₂O + ácido acético.

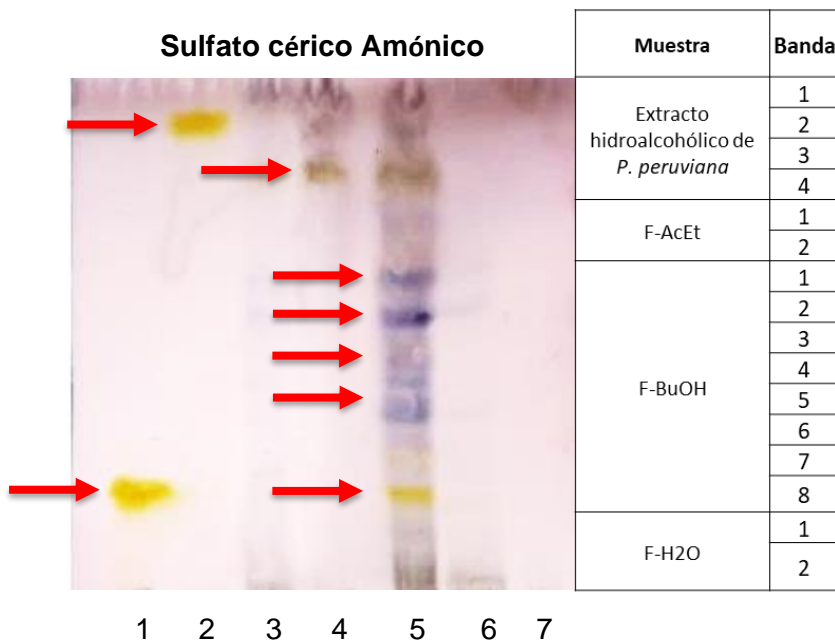


Figura 2-3. CCD revelada con sulfato cérico amónico.

36 Estudio de la actividad de un extracto de cálices de *Physalis peruviana* sobre estrés oxidativo en roedores con diabetes mellitus tipo II

1) Rutina; 2) Quercetina; 3) Extracto *P. peruviana*; 4) FAcEt; 5) FBuOH; 6) FH₂O; FH₂O⁺

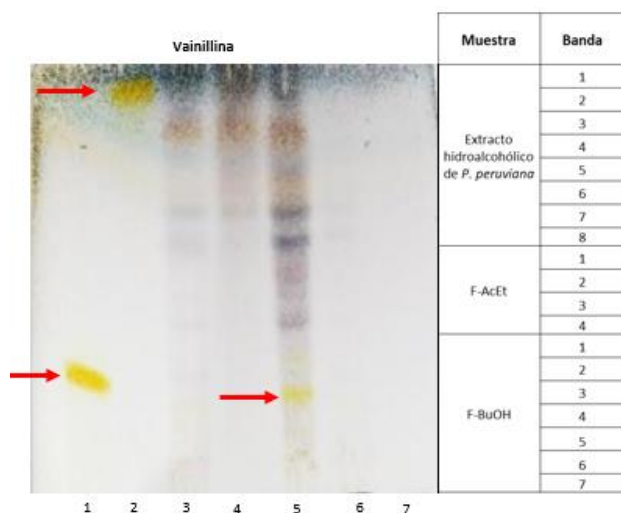


Figura 2-4. CCD revelada con Vainillina.

1) Rutina; 2) Quercetina; 3) Extracto *P. peruviana*; 4) F-AcEt; 5) FBuOH; 6) FH₂O; 7) FH₂O⁺

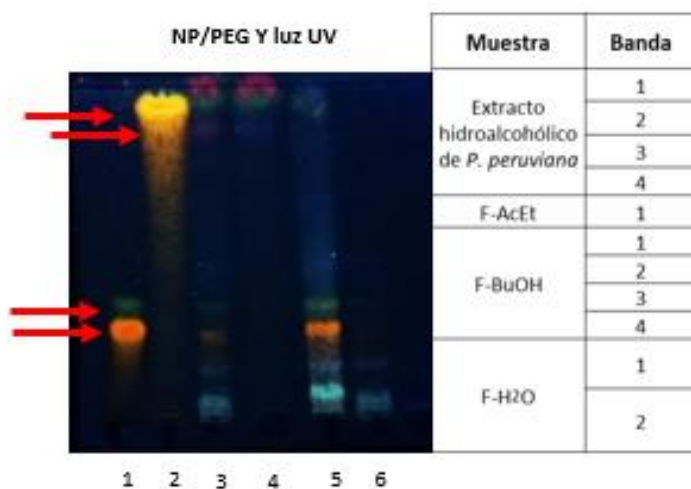


Figura 2-5. CCD revelada con reactivo NP/PEG y luz UV.

1) Rutina; 2) Quercetina; 3) Extracto *P. peruviana*; 4) F-AcEt; 5) FBuOH; 6) FH₂O.

En las placas es observable que en general la FBuOH presenta el flavonoide rutina, así como varios compuestos de polaridad similar a esta molécula. Se puede evidenciar la presencia de su aglicona quercetina la cual tiene menor interacción con la fase

estacionaria por su tendencia apolar al carecer de su glucósido, por esta conformación es que el flavonoide rutina cuenta con una polaridad media-alta. Ambas moléculas se evidencian tras la utilización del revelador vainillina el cual es considerado un revelador universal, dando como resultado tinciones amarillas en presencia de flavonoides y taninos. Sin embargo, también se observaron líneas de coloraciones violáceas, rosa y café indicadoras de la presencia de estructuras esteroidales tanto en la FBUOH como en la FAcEt y en el extracto inicial. Tras la utilización del revelador sulfato cérico amónico se observaron manchas azules y verdes especialmente en la FBUOH que nuevamente indicaron la presencia de compuestos esteroidales y terpenos. Al revelar con el reactivo NP se observan manchas color naranja que nuevamente muestran la presencia del flavonoide rutina y quercetina, adicionalmente una mancha de color verde con un Rf de 0,27 observada tanto en FBUOH como en el extracto total lo cual indica la presencia de uno o varios flavonoides no identificado. Finalmente, se observó una mancha de color azul fluorescente con un Rf de 0,2 en FBUOH, en FAcEt y en el extracto hidroalcohólico, indicando la posible presencia de ácidos fenólicos.

2.5.2. Actividad captadora de DPPH

Este experimento ha sido altamente utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes compuestos, dado que es simple de realizar, y reproducible (Wu et al., 2004). Sin embargo, en este trabajo se utiliza como un experimento de tamizaje que no necesariamente se extrapola con la reacción dada en los tejidos celulares debido a que el radical DPPH· no se asemeja a los radicales peroxilo que son los que en realidad comprometen la viabilidad de las membranas celulares generando peroxidación lipídica, incluso antioxidantes que reaccionan con los radicales peroxilo no necesariamente lo hacen para DPPH· lo que puede no solo explicar los diferentes niveles de inhibición alcanzados sino como a lo largo de la realización de diferentes experimentos complementarios se pueden observar diferentes comportamientos. En la Tabla 2-2 se observa que los únicos extractos que alcanzaron el 50% de actividad inhibitoria fueron EP y la FBUOH. Estos resultados son coherentes con lo reportado por Gironés y colaboradores, los autores compararon la actividad captadora del radical

DPPH de: papaya, noni, azaí, maqui y tanto frutos como cálices de *P. peruviana*, demostrando que los cálices presentan una actividad de captación de este radical moderada, incluso casi cuatro veces más que los frutos de la misma planta (Gironés-Vilaplana et al., 2014). Con anterioridad, Cardona et al., 2017 demostraron la actividad antirradicalaria del extracto hidroalcohólico obtenido de los cálices de *P. peruviana*, utilizando material vegetal recopilado en diferentes regiones de Colombia y sometiendo el proceso de extracción a diferentes condiciones de almacenamiento y estrés, este estudio reportó un porcentaje de captación del radical DPPH· de 50,9 % en extractos de cálices sometidos a oxidación con H₂O₂, y de 61,0 % en muestras intactas a 300 µg/mL, esta actividad fue atribuida al contenido del flavonoide rutina. En un estudio reportado en el 2010, la actividad anti radicalaria de la molécula rutina demostró actividad antioxidante más alta frente a sus derivados, ésta marcada actividad fue explicada por la estabilidad del flavonoide después de donar el hidrógeno al radical DPPH· (Lue et al., 2010). Otros estudios reportaron la actividad antirradicalaria del flavonoide rutina, mostrando un 52% de inhibición probada a una concentración de 25 µM, lo cual es consistente con estos resultados y con un estudio adicional que reportó una mayor actividad antioxidante en la fracción butanólica debido a los compuestos presentes a esta polaridad del solvente (Lue et al., 2010); de hecho, Ang et al., 2011 en su estudio menciona las posibles interacciones antagónicas al mezclar alimentos con actividad antioxidante y dentro de estas, la variabilidad que pueden presentar en cuanto a su contenido fitoquímico de acuerdo con el tipo de solvente utilizado para su extracción (Ang et al., 2011). Otras moléculas como el kaempferol, los derivados de los ácidos cafeico, clorogénico, ferúlico y cinámico presentes en FBUOH han mostrado actividades antirradicales (de Paiva et al., 2013; Rodrigo and Libuy, 2014).

Tabla 2-2. Captación de radicales DPPH por el extracto total y la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana*.

% de inhibición		
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	EP	FBuOH
14	25 \pm 4	12 \pm 1
28	52 \pm 4	22 \pm 3
42	61 \pm 1	30 \pm 4
56	74 \pm 2	45 \pm 3
70	79 \pm 2	81 \pm 1
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	29 (26-31)	52 (46-59)

EP: Extracto *Physalis peruviana*; FBuOH: Fracción butanólica de *P. peruviana*; IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

Los resultados muestran una mayor actividad de EP frente a la captación del radical DPPH, esta información es útil en términos de conocer de manera rápida la capacidad antioxidante de los extractos en algunos tejidos pero se hace necesario realizar experimentos complementarios para concluir con mayor aproximación la capacidad de los extractos para captar radicales libres (Mansour et al., 2011). Aunque se esperaría que FBuOH presentara mayor actividad antioxidante, dada la polaridad del solvente *n*-butanol y el contenido concentrado de flavonoides especialmente en esta fracción, se considera que varios compuestos en la matriz de EP podrían estar interactuando (Mansour et al., 2011) demostrando para este experimento una concentración inhibitoria inferior que FBuOH.

2.5.3. Reacción de Fenton inducida en homogenado de órganos

El hierro es considerado un metal de transición esencial para la mayoría del organismo. Sin embargo, es un catalizador para la producción del radical OH \cdot proveniente del H₂O₂ tras la reacción de Fenton (Ohkawa et al., 2010). Este radical hidroxilo se considera uno de los más dañinos a nivel celular ya que ataca los ácidos grasos que constituyen la membrana (Shen et al., 2016); dado estos efectos nocivos se hace relevante el estudio protector que los extractos de cálices de *P. peruviana* puedan alcanzar y siendo

promisarios para complementar las terapias antidiabéticas. Los ensayos realizados sobre homogenados de tejidos a los cuales se les indujo peroxidación lipídica *in vivo*, fueron expuestos al contacto con el extracto y las fracciones a diferentes concentraciones como se observa en la Tabla 2-3, la actividad antioxidante de EP y de FBuOH, está presente para los tres órganos evaluados, sin embargo, se puede apreciar una menor actividad en páncreas, cuyos valores de IC₅₀ fueron más altas. En el caso FAcEt, esta fracción mostró actividad antioxidante aumentada en cerebro y páncreas con IC₅₀ más bajas: 1077 µg/mL y 514 µg/mL. Como antioxidante de referencia se utilizó el flavonoide rutina (200 µg/mL) el cual tuvo un porcentaje de inhibición de 82 %, 80 % y 86 % en homogenados de hígado, cerebro y páncreas respectivamente.

Tabla 2-3. IC₅₀ del extracto y las fracciones de *Physalis peruviana* en peroxidación lipídica inducida por FeSO₄.

µg/mL	Hígado	Cerebro	Páncreas
EP	799 (712-895)	1127 (991-1281)	1222 (1094-1365)
FAcEt	-	1077 (925-1255)	514 (467-565)
FBuOH	983 (934.5-1034)	540 (457-637)	1342 (1177-1531)
FH₂O	1751 (1316-2329)	-	-

EP: Extracto; FAcEt: Fracción acetato de etilo; FBuOH: Fracción butanólica; FH₂O: Fracción acuosa; IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

Adaramoye & Odunola (2011) estudiaron la actividad antirradicalaria sobre homogenados de hígado y cerebro, sugiriendo que el mecanismo de protección en la peroxidación lipídica *in vivo* dada por la reacción de Fenton podría estar relacionado a la presencia de compuestos fenólicos, lo que podría explicar el efecto del extracto crudo (EP) y de la FBuOH los cuales dada la polaridad del *n*-butanol deberían contener la mayoría de estos compuestos (Lue et al., 2010). Previos autores, mencionan la capacidad del flavonoide rutina como quelante del Fe²⁺ inhibiendo así el proceso de peroxidación (Guo et al., 2007). Este modelo *in vivo* permitió inferir el comportamiento del extracto y las fracciones sobre esta reacción ya reportada *in vivo* en ratas diabéticas en las que el flavonoide rutina demostró su actividad quelante de metales liberados

durante la unión a proteínas, captándolos e interrumpiendo la reacción (Je et al., 2002). Por otra parte, el cerebro es uno de los órganos que por su alto contenido de lípidos y su pobre capacidad antioxidante endógena, es altamente susceptible ante el ataque de radicales libres (Lee et al., 2020). Los resultados muestran que FBuOH tuvo mayor protección del tejido cerebral con la menor IC_{50} (540 $\mu\text{g/mL}$), seguido por AcEt (1029 $\mu\text{g/mL}$) y EP (1779 $\mu\text{g/mL}$). En el homogenado de páncreas, exceptuando la fracción H_2O , todas las fracciones alcanzaron un IC_{50} protector para peroxidación lipídica. Oboh y colaboradores reportaron la relación entre el status de peroxidación lipídica y la presentación de resistencia a insulina en pacientes diabéticos así como con la destrucción de islotes de Langerhans y demostraron la actividad preventiva y protectora antioxidante del flavonoide rutina a dosis dependiente frente a radicales libres (Oboh et al., 2015). Otros estudios que apoyan los resultados demostraron la alta susceptibilidad del páncreas al daño celular en diabetes dado que la expresión de genes para la producción de enzimas antioxidantes endógenas (SOD-Mn mitocondrial, SOD Cu/Zn citoplasmática, glutatión y catalasas) es menor en este órgano comparado con hígado, riñón, cerebro, entre otros (Lenzen et al., 1996). Sin embargo, los resultados permiten inferir que los extractos probados podrían estar generando una actividad preventiva ante el daño pancreático por estrés oxidativo. En el caso del hígado EP se mostró con mayor actividad contra peroxidación lipídica (IC_{50} 799 $\mu\text{g/mL}$), seguido de FBuOH y FH₂O para las cuales se obtuvieron IC_{50} 983 $\mu\text{g/mL}$ y 1751 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por ser este órgano el que más almacena hierro por su relevancia en diferentes procesos celulares, tiene mayor riesgo de sufrir procesos de oxidación si este metal se encuentra en exceso y sobre todo en condiciones patológicas (Ohkawa et al., 2010). Sin embargo, en condiciones normales el hígado es uno de los órganos que expresa mayores niveles de enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa, Cu/Zn SOD y Mn-SOD (Lenzen et al., 1996). Los resultados obtenidos en este ensayo permiten confirmar el efecto protector principalmente de EP y FBuOH en la mayoría de los órganos.

2.5.4. Dienes conjugados (CD) en LDL

La inducción de la oxidación de moléculas de LDL *in vivo* se considera un ensayo relevante para extrapolar los efectos *in vivo* (Lue et al., 2010). La importancia de este ensayo viene dada por el gran contenido de moléculas sensibles a la oxidación dentro de las LDL, como son los ácidos grasos poliinsaturados y una vez iniciado el proceso de peroxidación lipídica en estas moléculas, comienza la formación de otros productos que dentro del proceso fisiopatológico de la diabetes están relacionados con complicaciones vasculares y aterosclerosis (Dos et al., 2018). Al comienzo de la oxidación, los hidroperóxidos son el primer producto generado, seguido de un reordenamiento conocido como dieno. Este estado de oxidación hace a los PUFA's, incapaces de ser reconocidos por su receptor y por ello se desencadenan varios eventos de tipo inflamatorio, además de la formación de células espumosas y ateromas. Estos eventos son significativos durante el curso de la diabetes *in vivo* y una de sus consecuencias, la aterosclerosis (Levitan et al., 2010). Los resultados mostrados en la Tabla 2-4 corroboran la mayor capacidad inhibitoria en la formación de dienos a partir de EP y FBuOH a diferencia de las demás fracciones, las cuales no mostraron inhibición. Los mecanismos involucrados en la inhibición podrían estar relacionados con el aumento de la fase de inicio de la reacción, en la que las LDL resisten a ser oxidadas o deteniendo la fase de propagación (Dos Santos et al., 2018). De acuerdo con otros estudios, se ha demostrado que el flavonoide rutina prolonga la fase de retraso de la oxidación dando lugar a la formación de cantidades más pequeñas de dienos conjugados durante la fase de propagación (Lue et al., 2010). En otros estudios, la presencia de rutina a partir del trigo sarraceno *Fagopyrum tataricum*, *Fagopyrum esculentum* y *Fagopyrum homotropicum* se correlacionó con su capacidad antioxidante sobre LDL (Jiang et al., 2007). Por otro lado, los derivados del ácido cafeico presentes en la fracción butanólica pueden estar relacionados con estos efectos protectores según otros informes que corroboran su actividad antioxidante en LDL (Abu-Amscha et al., 1996). Gran relevancia tiene el estudio de diferentes moléculas que puedan impedir la oxidación de las LDL y de otras lipoproteínas relacionadas. Evaluar en este modelo *ex vivo* es una

manera de representar con gran aproximación el evento oxidativo que sucede *in vivo* pero garantizando la ausencia de sustancias antioxidantes que están presentes en las paredes vasculares y que intervendrían de manera fisiológica para contrarrestar el ataque de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Parthasarathy et al., 1999; Soler, 2009).

Los resultados obtenidos demostraron que EP y FBuOH presentaron mayores porcentajes de inhibición en la formación de dienos y los valores alcanzados permitieron calcular las respectivas IC₅₀. Los mecanismos involucrados en la inhibición podrían estar relacionado con el aumento en la fase de iniciación de la reacción en la cual las LDL se resisten a ser oxidadas o bien deteniendo la fase de propagación (Dos Santos et al., 2018) (Dos Santos et al., 2018).

Tabla 2-4. IC₅₀ del extracto y fracciones en la formación de dienos conjugados

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% de inhibición		
	EP	FBuOH	AG
25	2 \pm 2	22 \pm 3	23 \pm 3
50	22 \pm 2	41 \pm 3	23 \pm 2
100	42 \pm 2	49 \pm 2	41 \pm 2
200	50 \pm 3	54 \pm 2	90 \pm 2
400	59 \pm 1	82 \pm 1	95 \pm 0
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	211 (166-267)	103 (78-135)	95 (8-115)

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50; EP: Extracto; FBuOH: Fracción butanólica; AG: ácido gálico. (Límites de confianza expresados entre paréntesis)

Laguerre y colaboradores mencionan la presencia de dienos conjugados en el 90% de los hidroperóxidos formados después de estabilizarse el radical y generándose la doble unión (Laguerre et al., 2007). Estas dobles uniones no conjugadas sólo se forman a partir de ácidos grasos insaturados presentes en las membranas (Boudreau et al., 2019).

Acorde con los resultados anteriormente presentados, tanto los niveles de peroxidación lipídica en plasma como la formación de dienos conjugados en LDL fueron inhibidos en mayor medida por la FBuOH. Ambos experimentos sirven para dar una mirada hacia la actividad protectora y/o preventiva de los extractos sobre el proceso oxidativo de

células presentes en la sangre y en la pared vascular, que tras su oxidación intervienen en la aparición de aterosclerosis como una complicación de la diabetes mellitus (Smith et al., 1992). Estudios relacionan la presencia de polifenoles (rutina, Kaempferol, quercetina, ácido cafeico, ácido gálico y ácido clorogénico) con la inhibición de la peroxidación lipídica en LDL y en plasma sanguíneo (Dos Santos et al., 2018).

2.5.5. Peroxidación lipídica inducida en plasma por CuSO₄

La peroxidación lipídica en plasma es el inicio de una serie de reacciones oxidativas que pueden relacionarse con las complicaciones comunes en enfermedades crónicas como la diabetes. La Tabla 2-5 presenta los porcentajes de inhibición de la peroxidación inducida por CuSO₄ para cada extracto demostrando que los niveles de *T-BARs* se vieron atenuados en presencia de todas las fracciones probadas. Sin embargo, EP y FBUOH demostraron mayores porcentajes de inhibición, con menores IC₅₀, indicando la capacidad del extracto para inhibir en un 50% la formación de *T-BARs* y disminuyendo la susceptibilidad del plasma a la oxidación por CuSO₄.

Tabla 2-5. IC₅₀ del extracto y fracciones en peroxidación lipídica en plasma

Concentración (µg/mL)	% de inhibición				
	EP	FACet	FBUOH	FH ₂ O	AG
25	38 (± 2)	5 (± 1)	22 (± 0)	38 (± 1)	32 (± 2)
50	43 (± 2)	28 (± 2)	33 (± 3)	43 (± 1)	49 (± 2)
100	48 (± 1)	35 (± 3)	53 (± 3)	46 (± 1)	60 (± 1)
200	53 (± 1)	51 (± 1)	72 (± 2)	52 (± 2)	62 (± 0)
400	71 (± 2)	63 (± 1)	78 (± 2)	56 (± 1)	68 (± 0)
IC ₅₀ (µg/mL)	127 (92-175)	263 (190-362)	92 (84-102)	165 (149-183)	45 (34-59)

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50; EP: Extracto; FACet: Fracción acetato de etilo; FBUOH: Fracción butanólica; FH₂O: Fracción acuosa; IC₅₀: Concentración inhibitoria 50; AG: ácido gálico. (Límites de confianza expresados entre paréntesis).

Partiendo del contenido previamente confirmado de rutina en el extracto estandarizado (Toro et al., 2014), el resultado presentado es coherente con los beneficios antioxidantes de la rutina así como de su aglicona quercetina, estos han demostrado que adicional a la actividad donadora del átomo de hidrógeno que ejerce la molécula antioxidante, también forma complejos con metales como Fe (II) y Cu (II) dentro de la bicapa celular promoviendo un efecto protector que de acuerdo a los autores podría ser útil a su vez para contrarrestar diferentes procesos crónicos *in vivo* (Bakowska-Barczak & Gabrielska, 2001). Resultados similares mostraron niveles más bajos de MDA en plasma sanguíneo en presencia de CuSO₄ y tratado con la fracción butanólica y un extracto acuoso de *Thymus satureioides*, los autores correlacionan el contenido fenólico con la capacidad antioxidante del extracto (Ramchoun et al., 2015). Otros estudios demostraron el efecto protector del extracto de hoja de *Syzygium cumini* contra la oxidación de las membranas en cuyo contenido se observaron ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina, quercetina y kaempferol (Dos Santos et al., 2018).

2.5.6. Actividad inhibitoria sobre carbohidrasas intestinales

2.5.6.1. Inhibición de α -amilasa

En este ensayo, la mayor absorbancia está relacionada con mayor concentración del producto de la unión covalente entre el almidón y almidón azul (remazol azul brillante) el cual es insoluble hasta que entra en contacto con la enzima (Rey Padilla, 2015). Previamente se evaluó el extracto de los frutos de *P. peruviana* alcanzando una IC₅₀ =620 μ g/mL con una inhibición máxima de 91% a una concentración de 10240 μ g/mL (Rey et al., 2015). Por otra parte, una fracción de diclorometano obtenida a partir del extracto fue evaluada presentando inhibición de la enzima, actividad atribuida a la presencia de ésteres de sacarosa: Peruviosas A-F, siendo las D y B las más potentes (Bernal et al., 2018). Antecedentes comprueban que el flavonoide rutina presenta una fuerte inhibición de esta enzima (IC₅₀ =0,043 μ M) siendo esta actividad mayor que la reportada en este estudio para su aglicona quercetina (IC₅₀ =0,061 μ M).

Otros estudios que evaluaron compuestos obtenidos de la corteza de *Syzygium alternifolium* (terpenoides friedelina y 3 β -friedelinol pentacíclico) demostraron la inhibición de esta enzima, reduciendo los NGS pero además atenuando la formación de radicales libres (Reddy et al., 2015).

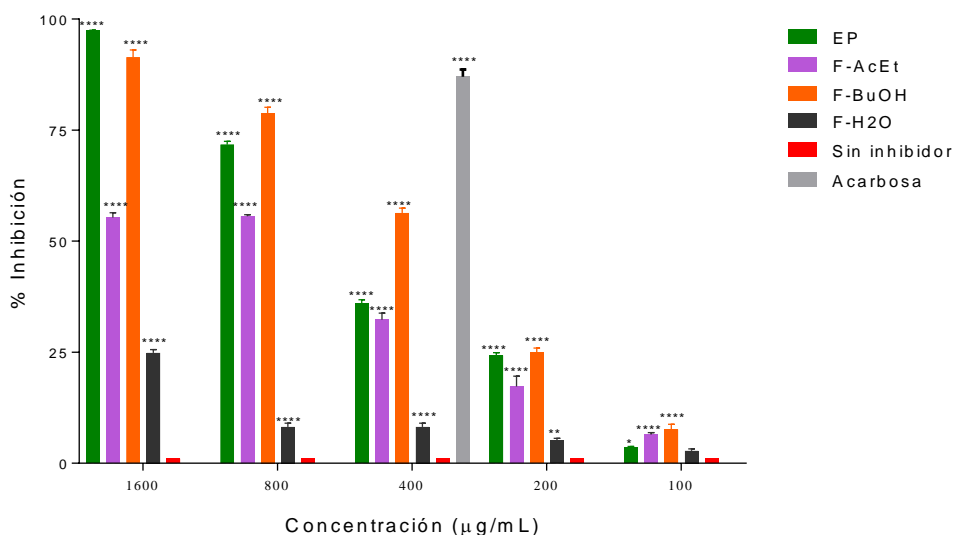


Figura 2-6. Actividad inhibitoria de las fracciones y el extracto etanólico de cálices de *Physalis peruviana* sobre alfa amilasa.

Se aplicó ANOVA de 2 vías ($\alpha < 0,05$) y prueba *post-hoc* Bonferroni ($p < 0,05$), $n=3$.

En humanos, α -amilasa es la más abundante de las carbohidrasas dado que la dieta de la mayoría de los humanos está cargada de altos contenidos de carbohidratos, por lo que desde la boca inicia la actividad de clivaje del carbohidrato, realizando los respectivos cortes internos, en el estómago se realizan los cortes en los enlaces α 1-4 con el fin de generar carbohidratos más pequeños que se absorben rápidamente en las vellosidades intestinales aumentando así, los niveles de glucosa en sangre posprandial. Por esta razón, inhibir a esta enzima cobra gran importancia como estrategia en la prevención de complicaciones en pacientes con diabetes mellitus tipo II (Olabiya et al., 2016).

2.5.6.2. Inhibición de α -glucosidasa

Como se observa en la Figura 2-7, los tratamientos testeados no alcanzaron una IC_{50} para la inhibición de esta enzima mientras que la actividad inhibitoria del fármaco patrón (Acarbosa 1mg/mL) fue de 83.8%. Esta información concuerda con los resultados reportados anteriormente en cuyo análisis *in vivo* no se observó la actividad inhibitoria (IC_{50}) por parte de los cálices de *P. peruviana* para esta enzima (Gironés-Vilaplana et al., 2014). Teniendo en cuenta el contenido de rutina del extracto de los cálices (Cardona et al., 2017) otros estudios probaron la actividad inhibitoria del flavonoide rutina sobre esta enzima alcanzando una $IC_{50} = 0.037 \mu M$ y para quercetina de $0.038 \mu M$, finalmente se demostró que fue la combinación de 75% rutina y 25% quercetina la que generó la mayor sinergia para inhibir α -glucosidasa (Obloh et al., 2015). Este comportamiento ha sido atribuido a las posibles interacciones entre los diferentes compuestos presentes en los extractos con la matriz de los mismos (Gironés-Vilaplana et al., 2014).

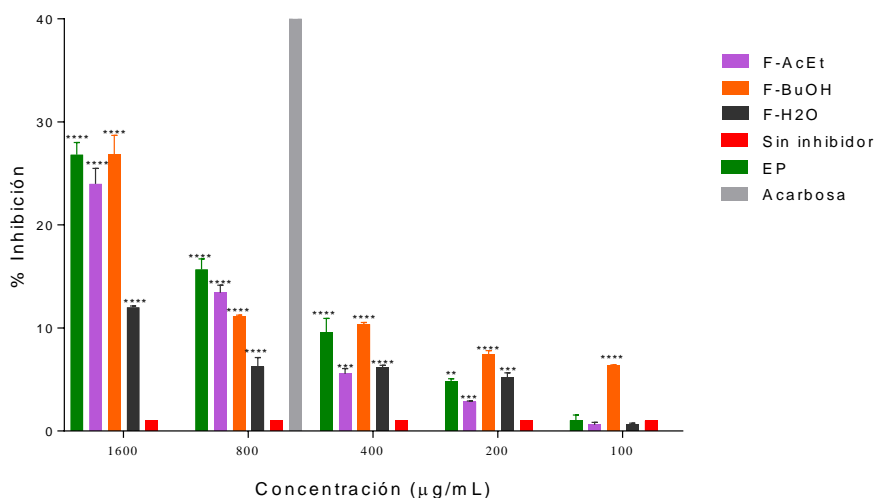


Figura 2-7. Actividad inhibitoria de las fracciones y el extracto etanólico de cálices de *Physalis peruviana* sobre alfa glucosidasa.

Se aplicó ANOVA de 2 vías ($\alpha=0,05$) y prueba *post-hoc* Bonferroni ($p<0,0001$).

Estudios previos muestran la inhibición enzimática de α -glucosidasa *in vivo* de la rutina a concentraciones entre 3,125 y 400 μM alcanzando los mayores niveles de inhibición a 50 y 100 μM (Fontana Pereira et al., 2011). Otros flavonoides por su parte

como quercetina, kaempferol y kampferitrina, demostraron efectos inhibitorios (kampferitrina 23% pero con resultados interesantes al testear en modelos *in vivo*). En el caso del flavonoide kaempferol este presentó significativa actividad inhibitoria a todas las concentraciones. Por otra parte, Rey y colaboradores reportaron actividad inhibitoria del extracto de frutos con $IC_{50}=4553 \mu\text{g/mL}$ alcanzando una inhibición máxima de 57,0% a la mayor concentración testeada 10240 $\mu\text{g/mL}$ a los 45 minutos (Rey et al., 2015). Dada la concentración probada en este último estudio se puede inferir la baja potencia de la actividad inhibitoria también de los frutos.

2.5.7. Determinación de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) en el modelo de albúmina bovina

Los AGEs se consideran un cofactor esencial del desarrollo de DMT II (Diabetes Mellitus tipo II), aterosclerosis e hipertensión. La formación de AGEs empeora la fisiopatología de DMT II ya que, con estas especies reactivas presentes, el estado oxidativo se convierte en un estado crónico severo tras la oxidación de las proteínas (Perera, 2016). En condiciones patológicas *in vivo*, la formación de AGEs está presente como una complicación de la diabetes que aumenta el riesgo de enfermedad renal, retinopatía y aterosclerosis (Ohkawa et al., 2010). Como subproductos de la autooxidación de la glucosa, de la reacción de Maillard, de la glucólisis, de la peroxidación de lípidos y de la ruta de los polioles, aparecen tres compuestos dicarbonilos reactivos representativos de los AGEs; los cuales comprometen los sistemas antioxidantes endógenos (Nowotny et al., 2015). Los autores sugieren que las moléculas derivadas de extractos naturales pueden inhibir la formación de AGEs, al igual que los flavonoides pueden retrasar la propagación de EROs (Aragón-Novoa et al., 2021). Los resultados mostraron el efecto protector contra la formación de AGEs por parte de EP (141 $\mu\text{g/mL}$) mostrando el IC_{50} más bajo, seguido de FBuOH (203 $\mu\text{g/mL}$). FAcEt mostró una actividad protectora menor. Como se puede observar, todas

las fracciones mostraron un efecto protector contra la formación de AGEs inducida por la ribosa excepto FH₂O. Estudios previos informaron el efecto inhibitor de la quercetina y la rutina sobre el precursor de los productos de glicación, el metilglioxal (Wu & Yen, 2005). Adicionalmente, otros autores también sugirieron que la actividad protectora más significativa sobre la formación de AGEs estaba atribuida a la presencia de quercetina, berberina, ácido clorogénico y catequina; los mismos autores reportaron las actividades protectoras inhibitorias del extracto etanólico de corteza de quinquina y extracto acuoso de yemas de sófora contra la vesperlisina y/o pentosidina como producto de glicosilación avanzada y se consideró al extracto etanólico de quinina como el mejor protector anti- AGEs, estos efectos se relacionaron con el flavonoide rutina como el principal compuesto presente en ambos extractos (Séro et al., 2013).

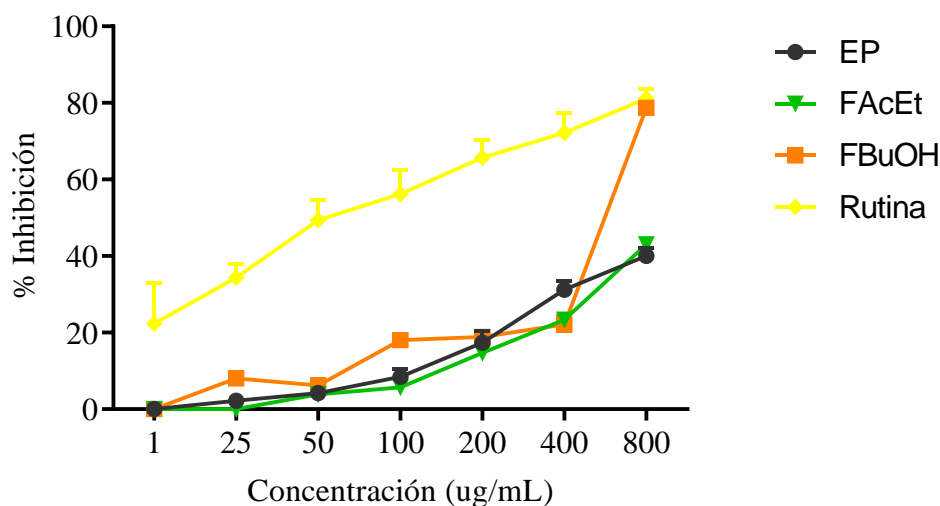


Figura 2-8. Efecto protector del extracto de *Physalis peruviana* y sus fracciones sobre la formación de AGEs a concentraciones entre 1 a 800 µg/mL.

Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3)

Cabe mencionar que dentro de la importancia de la disminución en la producción de AGEs se encuentra la influencia de estas moléculas sobre reacciones inflamatorias dadas por la interacción con sus respectivos receptores (Ishibashi et al., 2017).

2.7. Evaluación *in vivo* del efecto hipoglicemiante en modelos de hiperglicemia transitoria

2.7.1. Efecto de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* en el modelo de sobrecarga oral de glucosa

Antes de realizar este procedimiento, se realizó una prueba de toxicidad del extracto de cálices de *P. peruviana* de acuerdo con el protocolo OECD 420 en el que se utilizó un número mínimo de animales (n=3); en este caso ratones CD-1 a los cuales se administró el EP a una dosis de 500 mg/kg una vez al día durante 14 días. Se evaluaron cada 7 días los parámetros correspondientes a: alteraciones en la marcha, actividad exploratoria, sedación, estimulación, piloerección, lamido de patas y rascado de nariz, taquicardia, hiperexcitación, tendencia a huida, muerte en 24 horas (Kennedy et al., 2010). Durante las dos semanas de seguimiento no se detectaron alteraciones relevantes del desempeño motor de los animales, ni otros signos aparentes de toxicidad.

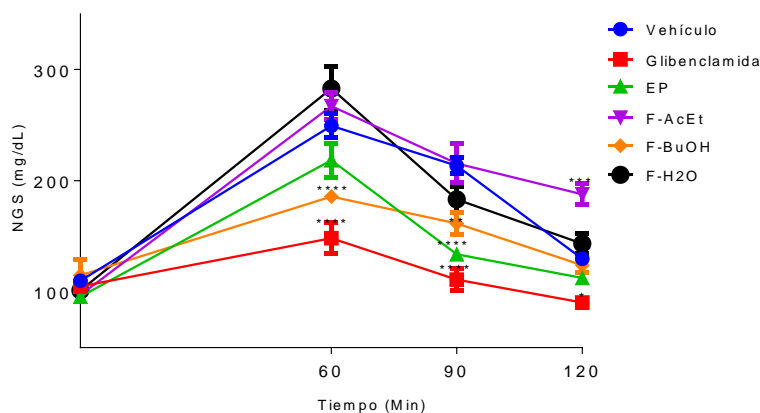


Figura 2-9. Actividad hipoglicemiante del extracto y fracciones de *Physalis peruviana* en un modelo de sobrecarga oral de glucosa en ratas Wistar.

Como se observa en la Figura 2-9, si bien todos los grupos presentaron al minuto 60 niveles de glucosa en sangre NGS que sobrepasan los 200 mg/dL de glucosa (excepto el grupo patrón que recibió glibenclamida) el grupo al que se administró la F-BuOH mostró

los NGS más bajos. Adicionalmente, a los 90 y 120 minutos EP y FBuOH lograron un efecto atenuante de la glicemia cercano al del patrón. El comportamiento inicial de EP aumentando los NGS podría deberse a la gran cantidad de carbohidratos presentes en los cálices hacia los primeros días de su origen (Gironés et al., 2014).

Estudios previos han demostrado el efecto sobre los NGS mediados por rutina en experimentos *in vivo* administrando el flavonoide a una dosis de 50 mg/kg en ratas indicando una reducción de los NGS antes de la administración de glucosa, aunque sin diferencias estadísticas después de administrar la sobrecarga. Los autores estudiaron la inhibición de alfa glucosidasa también *in vivo* encontrando actividad inhibitoria que relacionan con dicho comportamiento *in vivo*. Teniendo en cuenta el bajo alcance inhibitorio de los experimentos *in vivo* del presente estudio Figura 2-7 se podría inferir que la actividad antihiperglicemiante del extracto observada en la

Figura 2-9 podría estar mediada por otro tipo de mecanismo asociado a la activación de ciertas vías que pueden aumentar la secreción de insulina. Otros flavonoides como kampferitrina también han mostrado *in vivo* su actividad hipoglicemiante asociada al aumento en la captación de glucosa en músculo. Para el caso de Kaempferol y quercetina ambos en el estudio previamente mencionado, presentaron una actividad antihiperglicemiante *in vivo*, constatado por la experimentación de la inhibición de alfa glucosidasa *in vivo* (Fontana Pereira et al., 2011).

2.7.2. Efecto de los extractos de cálices de *Physalis peruviana* en el modelo de sobrecarga oral de almidón

Este ensayo, permitió identificar el pico máximo de NGS hacia las 2 horas, momento en el que se aprecia la diferencia del grupo patrón con NGS de 157 mg/dL, así como de la FBuOH los cuales alcanzaron un promedio de 166 mg/dL respecto al vehículo (209 mg/dL). Una vez más EP mostró un aumento en los NGS al inicio y FBuOH presenta niveles más bajos. Este experimento junto con los resultados

observados para la inhibición de α -amilasa, permiten corroborar la inhibición de la actividad de la α -amilasa y así, la hidrólisis de los enlaces 1,4 retardando el ingreso de azúcares simples al torrente sanguíneo, y con esto el pico máximo a los 120 minutos.

Este experimento es tenido en cuenta como parte de los experimentos screening por su utilidad para corroborar los experimentos *in vivo* que pueden arrojar información inicial del posible mecanismo hipoglicemiante o anti hiperglicemiante de los extractos y/o compuestos.

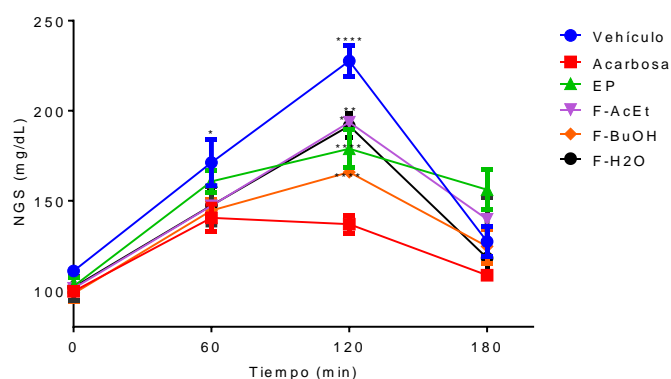


Figura 2-10. Actividad hipoglicemiante del extracto y fracciones de *Physalis peruviana* en un modelo de sobrecarga oral de almidón en ratas Wistar.

Vehículo: agua, glicerina y propilenglicol 80:10:10; Acarbosa 10 mg/kg, Extracto y fracciones 500 mg/kg. 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 vehículo.

Siguiendo los resultados de diferentes ensayos realizados para el extracto y las diferentes fracciones de los cálices de *P. peruviana*, se genera especial atención para profundizar en el estudio de la fracción butanólica (FBuOH) la cual inhibió la enzima α -amilasa disminuyendo los NGS *in vivo* y también demostró alta actividad protectora respecto a las demás fracciones previniendo la formación de radicales libres en tejidos biológicos.

2.8. Conclusiones

A partir del extracto de cálices de *P. peruviana*, para el cual ya se tenía evidencia de sus efectos protectores frente al ataque por radicales libres, la fracción butanólica presentó una mayor complejidad en su composición, denotando gran cantidad de compuestos de polaridad media alta. Adicionalmente, la presencia de flavonoides, posibles taninos y esteroides fue confirmada, lo que complementa el efecto protector del extracto por lo que se esperaría a lo largo del desarrollo de los experimentos de tamizaje presentados en el siguiente capítulo que la fracción butanólica fuera también una de las más promisorias para el tratamiento de diabetes mellitus.

Los cálices de *P. peruviana* demostraron efectos promisorios sobre algunas de las complicaciones involucradas en la diabetes mellitus como lo son estrés oxidativo y niveles de glucosa en niveles que superan los normales y que, en condiciones patológicas, permanecen por tiempos prolongados. Hasta ahora, esta información preliminar obtenida de los experimentos de tamizaje anteriormente presentados es un interesante punto de partida para profundizar en la investigación de los posibles modos de acción principalmente de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* después de arrojar resultados preliminares de su potencial frente a la reducción de los NGS posprandial y de su potencial anti radicalario

3. Capítulo: Composición química de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana*

Una vez realizados los análisis descritos en el capítulo anterior, se procedió a cuantificar los fenoles contenidos tanto en el extracto como en la FBUOH. Lo anterior proporcionó una estimación cualitativa aproximada de compuestos dentro de los cuales se encontrarían flavonoides y otros metabolitos y posteriormente se analizó el perfil metabólico de FBUOH, a través de un análisis de dereplicación no dirigido y cotejado con información previamente almacenada en una base de datos construida por el laboratorio (*in house*), permitiendo asignar la presencia de diferentes posibles metabolitos. De manera complementaria, se realizó un segundo análisis dirigido en busca de confirmar compuestos previamente reportados en la literatura y que no fueron observados en el primer análisis (Medina et al., 2019).

Con la información que se presenta en este capítulo se obtuvo un importante aporte de esta tesis hacia los posibles compuestos presentes en FBUOH y su posible contribución en los resultados observados en los experimentos screening, así como en los experimentos realizados sobre el modelo crónico de diabetes mellitus inducido por dieta alta en grasas y estreptozotocina en dosis bajas, el modelo de síndrome metabólico inducido por consumo de fructosa en agua de bebida y en el modelo de células RAW 164.7.

3.1. Equipos y reactivos

Reactivo Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich), Carbonato de Sodio, espectrofotómetro UV-Vis Genesys2, columna RP-18 (Phenomenex Luna Omega 1.6 μm , 2,1 x 150 mm); acetonitrilo, metanol y ácido fórmico grado CLAE/HPLC, agua de calidad CLAE

obtenida a través del sistema MilliQ de Millipore Co[®], triple cuadrupolo LC/MS Shimadzu 8045, equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia, Shimadzu LC-6AD con inyector automático detector con UV-vis con arreglo de diodos, Bruker Maxis-HD-q-TOF.

3.2. Metodología

3.2.1. Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo el protocolo propuesto por Singleton y colaboradores (1999). Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico (AG) y se prepararon las diluciones correspondientes para obtener valores finales de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL.

Las muestras se prepararon a una concentración final de 1000 µg/mL Procedimiento: Se realizó una mezcla que contenía: 100µL de la fracción, 100 µL de Na₂CO₃ al 20%, 750 µL agua ultrapura, 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N. Posteriormente se colocó cada microtubo en vórtex por 20 segundos y la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente protegida de la luz durante 1 hora. Finalmente, la absorbancia fue medida a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys2 (Singleton., Orthofer., & Lamuela-Raventós, 1999).

3.2.2. Análisis de perfilado metabólico

Una vez realizados los experimentos de tamizaje y evidenciándose la actividad promisorio del extracto hidroalcohólico de los cálices de *Physalis peruviana*, así como de la FBuOH tanto *in vivo* como *in vivo* (*ver capítulo 3*), se procedió a analizarlos con el fin de identificar los compuestos presentes, los cuales podrían contribuir con la respuesta experimental. Esto se llevó a cabo junto con la colaboración del Departamento de Farmacognosia de la Universidad de Viena (Austria) a través de un

análisis de dereplicación no dirigida por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS). Esta metodología combina la información que brinda la cromatografía líquida de alta junto con un reporte de alta precisión del peso y la fórmula molecular de compuestos conocidos que han sido almacenados previamente en diferentes bases de datos en línea, que sirven como referencia para la determinación de posibles constituyentes de una muestra (Endale and Science, 2015). En este caso se utilizó una base de datos *in house* previamente construida en el laboratorio.

Para preparar las muestras, estas fueron disueltas en 1 mL de metanol, y luego fueron agitadas en vórtex durante 2 minutos. Posteriormente, fueron colocadas durante 10 minutos en un baño de ultrasonido a 25 °C y finalmente centrifugada para ser analizadas por cromatografía líquida.

Condiciones cromatográficas:

Fase estacionaria columna Phenomenex Luna Omega C18 (150 mm x 2,1 mm; 1.6 µm), fases móviles: Solución A, (H₂O+ ácido fórmico 0.2 %), Solución B, (ACN: MeOH (80:20) + ácido fórmico 0.2 %).

Tabla 3-1. Condiciones de gradiente de concentración de la fase móvil

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Concentración Sln B (%)	Concentración Sln A (%)
0.000	0.250	5	95
0.000	0.250	5	95
5.000	0.250	5	95
28.000	0.250	70	30
33.000	0.250	98	2
43.000	0.250	98	2
43.100	0.250	5	95
45.000	0.250	5	95

Para la detección se utilizó un equipo Bruker Maxis-HD-qTOF con modos de ionización positivo y negativo (100-1500 Da), capilaridad de voltaje: +2700 V, -2500 V.

Los parámetros instrumentales se describen a continuación:

Tabla 3-2: Parámetros de medida en espectrometría de masa

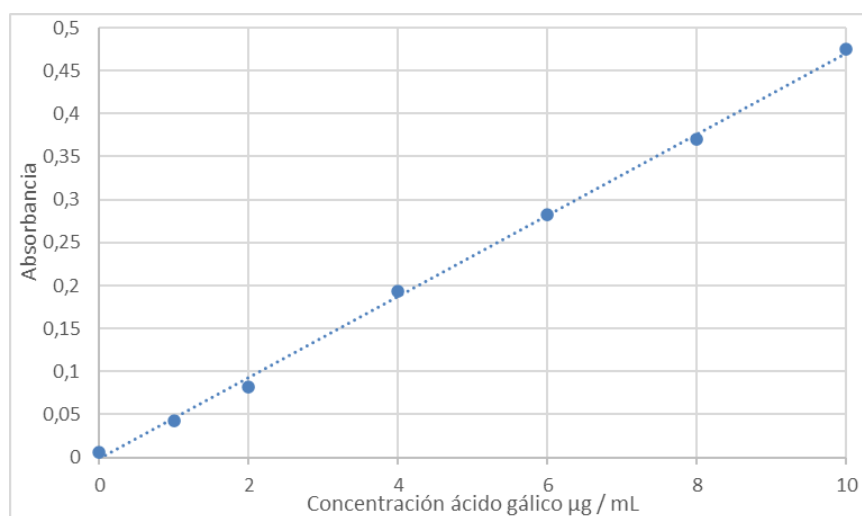
Desplazamiento de placa final	500 V	61 nA
Capilar	2500 V	113 nA
Nebulizador	0.4 Bar	0.4 Bar
Gas seco	4.0 L/min	4.0 L/min
Temperatura de secado	200	201

Finalmente, se realizó un análisis adicional dirigido, bajo las mismas condiciones de gradiente y fases móviles, con el fin de confirmar la presencia de metabolitos reportados previamente en la literatura, que no se evidenciaron en el análisis arriba mencionado. Para este análisis, se utilizó un equipo triple cuadrupolo LC/MS Shimadzu 8045.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Fenoles totales

La cantidad de fenoles totales se determinó por espectrofotometría, midiendo la absorbancia producto de la reacción de oxidación y reducción generada por el reactivo Folin-Ciocalteu. Para esta cuantificación, se realizó primero una curva de calibración con ácido gálico a varias concentraciones con el fin de interpolar estos valores con las absorbancias de las muestras a cuantificar y determinar así un valor cuantitativo de fenoles presentes en ellas. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/ g de muestra. Utilizando una curva de calibración de ácido gálico (AG) por interpolación de esta con las absorbancias de las muestras de la fracción se realizó la estimación de la concentración de fenoles totales dentro de la fracción de los cálices de *P. peruviana*. . La curva de calibración presentó un $R^2 = 0,9985$.



Los datos son expresados como la media \pm D.E. (n=3)

Figura 3-1. Curva de calibración de AG para cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Tabla 3-3. Fenoles totales del extracto de cálices de *Physalis peruviana* y la fracción butanólica

Muestra	mg de AG / g
EP	48 ($\pm 0,04$)
FBuOH	28 ($\pm 0,01$)

La cantidad de fenoles presentes en los cálices cobran importancia por su relación con la alta actividad antioxidante que estos confieren (Ramadan, 2011). Como se observa en la Tabla 3-3; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, la FBuOH presenta un 58% del contenido fenólico que puede estar presente en el extracto. Cuantificaciones previas realizadas en el mismo grupo de investigación reportaron un contenido de fenoles totales en los cálices de *P. peruviana* en un rango de $19,66 \pm 0,20$ a $20,30 \pm 0,40$ mg de AG/g, sin embargo, este estudio mostró que la cantidad de fenoles varían de acuerdo con las zonas y épocas de colecta, así como a las condiciones de extracción y almacenamiento del extracto. Por otra parte, este mismo estudio reveló que la cantidad del flavonoide rutina presente en la muestra fue de $5,12 \pm 0,03$ a $13,25 \pm 0,02$ μg rutina/mg de extracto (Cardona, 2014). Otras cuantificaciones reportadas en los frutos oscilan entre $40,45 \pm 0,93$ y $39,15 \pm 5,43$ mg de AG/100 g de muestra (Puente et al., 2011). Es importante aclarar que los reactivos utilizados en el método de Folin-Ciocalteu podrían interactuar con otras moléculas como los azúcares reductores como glucosa y fructosa generando valores sobre estimados en sus resultados (Muñoz-Bernal et al., 2017), razón que podría explicar los altos contenidos de fenoles presentes en el extracto durante este experimento.

Dada la relevancia del contenido del flavonoide rutina como marcador analítico, así como por su actividad antioxidante demostrado previamente, se determinó que su contenido en la fracción butanólica fue de $22 \mu\text{g}/\text{mg}$ y en el extracto $14,54 \mu\text{g}/\text{mg}$. Lo anterior, de acuerdo a la metodología para la cuantificación de rutina propuesta por el grupo de investigación (Cardona, 2014).

3.3.2. Análisis de Perfilado Metabólico

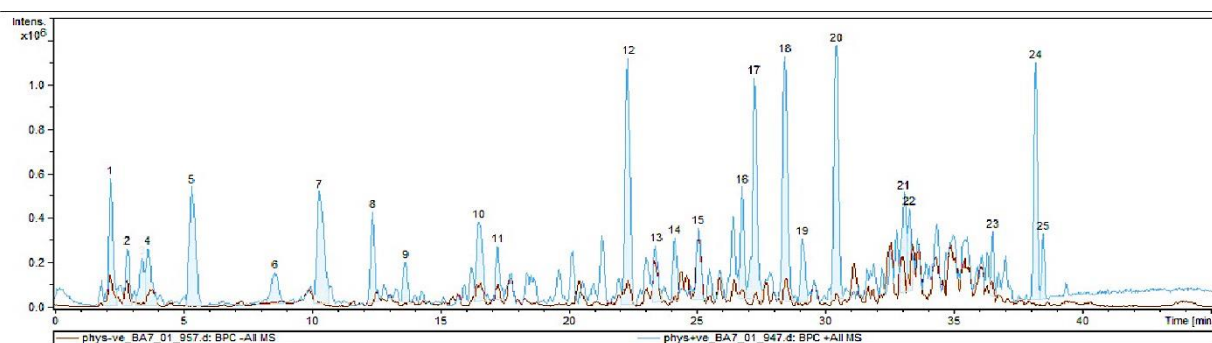
Tabla 3-4. Compuestos identificados en la FBUOH a través del método de dereplicación no dirigido

#	[M+H] ⁺ (m/z)	RT	Área	Posible compuesto	Posible ID (CAS)
1	116.0708	2.2	6680138	Aminoácido: L-Prolina	147-85-3
2	142.1230	2.9	2810985	Alcaloides tropánicos: 1) Tropina 2) Physoperuvina 3) Cicloheptanona, 3-(metilamino)	120-29-6 60723-27-5 73744-99-7
3	132.1024	3.4	2759332	Aminoácido: L-Isoleucina	61-90-5
4	132.1024	3.7	3675771	Aminoácido: S-Leucina	73-32-5
5	166.0868	5.4	8761530	Aminoácido: Fenilalanina	63-91-2
6	251.1399	8.6	2877906	Derivados de Acido cinámico: Cinamamida, N-(4-aminobutil)-3,4-dihidroxi-	8CI; 29554-26-5
7	205.0979	10.3	9139461	Amino Acido: L-Triptófano	73-22-3
8	265.1555	12.4	45393229	Derivados de Acido cinámico: Cinamamida, N-(4-aminobutil)-4-hidroxi-3-metoxi-	7CI,8CI; 501-13-3
9	474.2610	13.7	2022964	N/I	N/I
10	611.1622	16.5	5663280	Flavonoide rutina	8CI; 480-16-0
11	1037.5117	17.2	2652622	Witanólidos: Witaperuvina E	92125-38-7
12	1005.5214	22.3	14971186	Witanólidos: Witaperuvina M Phyperunolido A	1353093-20-5 1198400-48-4
13	233.1023	23.4	3245775	N/I	N/I
14	331.0817	24.1	2913771	Terpeno: Dihidroactinidiolida	17092-92-1
15	247.1182	25.1	4087021	N/I	N/I
16	977.5637	26.8	4565672	Witanólidos: 1) Witaferin A 2) Witanona 3) Witanólido D 4) 27-Hidroxiwitanólido B	5119-48-2 7CI; 27570-38-3 30655-48-2 60124-17-6
17	203.1797	27.2	12844741	Monoterpeno: Calameneno	73209-42-4
18	345.0974	28.4	14689013	Retinol	68-26-8
19	316.2853	29.1	3375421	Monoterpeno: β-Vetiveneno	27840-40-0
20	345.2429	30.4	13726374	N/I	N/I
21	289.2535	33.0	5550203	Biotina	58-85-5
22	289.2533	33.2	3910919	Ácido graso: Ácido linolénico, etil éster	1783-84-2
23	273.2581	36.5	2264958	Flavonoide 4',5,7-trihidroxi-	8CI; 480-41-1
24	621.3086	38.1	10006030	N/I	N/I
25	621.3088	38.4	2128388	N/I	N/I

N/I: No identificado

Al realizar una revisión de los compuestos reportados, La síntesis de prolina (1) según varios estudios se genera para proteger a la planta, cuando esta se encuentra expuesta a condiciones de estrés para estabilizar sus membranas (De La O-Quezada et al., 2011). Alcaloides tropanos como Physoperuvine (2-2) se habían identificado únicamente en partes aéreas, raíces (Kasali et al., 2022, 2021). Cicloheptanona, 3-(metilamino) (2-3) no se encuentra reportado en la planta, ni los derivados cinámicos sugeridos en la tabla (6, 7 y 8). El flavonoide rutina (10) identificado por su peso molecular así como por otros análisis previos se encuentra reportado en cálices y se considera de gran utilidad como marcador analítico (Toro & Arangon-Novoa, 2014). Witaperuvina M (12) se ha reportado previamente en partes aéreas y E (11) en frutas (Lock O et al., 2016; Mahrous et al., 2019). Así mismo, en tallos y hojas de la planta se han reportado hallazgos de Phyperunolido A (12). Se observa que compuesto sugerido como terpeno Dihidroactinidiolida (14) no se encuentra reportado para esta planta y las witaferinas A (16-1) así como las witanonas (16-2) han sido identificadas con anterioridad en las hojas de la planta (Sahin et al., 2020). El monoterpene calameneno (17) no se había reportado antes en la planta, así como el compuesto (23) flavanona, 4',5,7-trihidroxi.

Figura 3-2. Cromatograma de la FBuOH de cálices de *Physalis peruviana*.



Modo ion positivo (azul) y negativo (marrón).

62 Estudio de la actividad de un extracto de cálices de *Physalis peruviana* sobre estrés oxidativo en roedores con diabetes mellitus tipo II

Tabla 3-5. Flavonoides y fitoprostanos presentes en la FBuOH, reportados por LC/MS

Compuestos	Rt	[M-H] ⁻ m/z	MS ^a	Hexosa (-162)	Aglicona	Autor
Quercetina 7-O-glucósido 3-O-rutinósido	4.17	771 (T)		609	301	(Gironés-Vilaplana et al., 2014; Medina et al., 2019b)
Kaempferol 7-O-glucósido-3-rutinósido	4.8	755		593		(Gironés-Vilaplana et al., 2014; Medina et al., 2019b)
Quercetina 3-O-rutinósido	6.8	609*			301	(Franco LA, Matiz GE, Calle J, Pinzón R, 2007; Gironés-Vilaplana et al., 2014; Medina et al., 2019b; Toro et al., 2014)
Quercetina-3-O-glucósido	6.8	463			301	(Gironés-Vilaplana et al., 2014; Medina et al., 2019b)
Kaempferol 3-O-rutinósido	7.7	593*			285	(Franco LA, Matiz GE, Calle J, Pinzón R, 2007; Gironés-Vilaplana et al., 2014; Medina et al., 2019b; Toro et al., 2014)
9-Flt-PhytoP	5	327.2 (T)	171.1			(Gironés-Vilaplana et al., 2014)

(T) Tazas, (*): Mayoritario

Tabla 3-6. Compuestos fenólicos presentes en la FBuOH, reportados por LC/MS

Compuestos	Rt	[M-H] ⁻ m/z	MS ^a	[AF-H] ⁻	[AQ-H] ⁻	[AC-H] ⁻	[AF-H-18] ⁻	[AQ-H-18] ⁻	[p.CoA-H] ⁻	Autor
Ácido 3-O-cafeoilquinico	1.9	179 (T)								(Medina et al., 2019b)
Ácido 3-p-cumaroilquinico	2.6	337						173 (T)	166*	(Medina et al., 2019b)
Ácido 3-O-feruloilquinico	3.2	367		193*				173 (T)		(Medina et al., 2019b)
Ácido 5-O-cafeoilquinico	3.3	353			191*	179 (T)				(Gironés-Vilaplana et al., 2014; Medina et al., 2019b)
Ácido ferúlico hexosido	3.5	355	193*				175			(Medina et al., 2019b)
Ácido ferúlico hexosido	3.8	355	193*				175			(Medina et al., 2019b)
Ácido ferúlico hexosido	4.1	431	385 205 153*							(Gironés-Vilaplana et al., 2014)

(T) Trazas, (*): Mayoritario

Como se lista en las anteriores tablas, tanto el análisis de dereplicación como el posterior análisis de LC/MS realizado como complemento, demostraron que la fracción butanólica de los cálices de *P. peruviana* contiene una variedad de ácidos fenólicos y

flavonoides de los cuales se identificó principalmente el flavonoide rutina (quercetina 3-*O* rutinósido), derivados del ácido cinámico y witanólidos (witaperuvina E, M, phyperonolida A, witaferina A, witanona, witanólido E y 27-Hidroxiwitanólido B así como terpenos y derivados). Otros compuestos anteriormente mencionados en la literatura y dereplicados en las muestras analizadas de los cálices son: fitoprostano 9-Flt-PhytoP, flavonoides: quercetina 7-*O*-glucósido-3-*O*-rutinósido, kaempferol 7-*O*-glucósido-3-*O*-rutinósido, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina 3-*O*-rutinósido y Kaempferol 3-*O*-rutinósido siendo estos 2 últimos los mayoritarios. Adicionalmente, otros compuestos mayoritarios fueron corroborados, detectándose derivados de ácido cafeico, cumárico, y especialmente del ácido ferúlico (Ácido 3-*O*-feruloilquínico y ácido ferúlico hexóxido). Cabe resaltar que en investigaciones realizadas por el grupo de investigación se ha identificado previamente la presencia de: rutina (quercetina 3-*O*-rutinósido) (Toro et al., 2014) así como de Peruviosa A y Peruviosa B (Franco et al., 2014), estos hallazgos fueron un punto de partida para profundizar en el contenido de la fracción y los beneficios antidiabéticos de sus compuestos.

3.4. Conclusiones

Dentro de los compuestos encontrados en FBUOH algunos de estos no se encuentran aún reportados en la literatura para los cálices, incluso para la planta. Algunos de estos tienen relevancia como antioxidantes como el caso de los flavonoides y ácidos fenólicos y sobre la regulación de glicemia y perfil lipídico. Dentro de los compuestos relevantes se encuentran las Peruviosas con potencial actividad antiinflamatoria y antidiabéticos al igual que Quercetina 3-*O*-rutinósido para la cual se han venido adelantando diferentes estudios por parte del grupo de investigación que refuerzan su potencial antioxidante y antihiperlipémico. Por último, se comprobó la presencia de ácidos fenólicos (ácido cafeico y derivados de ácidos ferúlicos) en los que se ha demostrado su capacidad antioxidante e inmunomoduladora. Los compuestos identificados en FBUOH son promisorios y dados los resultados preliminares obtenidos en los experimentos de tamizaje *in vivo* se determinó continuar con la evaluación de la FBUOH en modelo crónico de diabetes y de síndrome metabólico.

4. Capítulo: Efecto de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* en un modelo de diabetes por consumo de dieta alta en grasas y administración de STZ a dosis bajas repetidas

Existen numerosos modelos en roedores en los que se desarrolla diabetes mellitus de forma aproximada a la patogénesis en el humano. El uso de la estreptozocina (STZ) ha sido un coadyuvante de alta utilidad para la inducción de la enfermedad por su propiedad diabetogénica al producir daño de las células β pancreáticas. Sin embargo, su utilización en dosis bajas repetidas ha demostrado generar un daño no excesivo, con progresiva con progresiva y marcada insulinitis, lo que dispara poco a poco reacciones de tipo inmune contra las mismas células del páncreas, muy características en la diabetes mellitus (Like & Rossini, 2016). Adicionalmente, recordando la complejidad del síndrome diabético y sus múltiples complicaciones como la resistencia a insulina, Furman y colaboradores plantean el modelo que combina una administración de streptozotocina a dosis moderada con la alimentación con dieta alta en grasas durante 3 semanas (Furman, 2015). Sin embargo, otros autores proponen que la utilización de esta combinación utilizando la STZ en dosis bajas moderadas con algunos días de intervalo entre aplicaciones, obteniendo animales diabéticos con niveles de glucosa aproximados a 252 mg/dL (Zhang et al., 2008). Por esta razón en el modelo inducido que se presenta a continuación se utilizó la administración de una dieta alta en grasas y la administración de STZ en dosis bajas repetidas.

En este capítulo se estudió el comportamiento de diferentes parámetros importantes en animales diabéticos tratados con la FBUOH a dos dosis de 50 y 100 mg/kg como niveles de glucosa en sangre en el transcurrir del tiempo, niveles de glucosa durante

una sobrecarga oral de carbohidratos, niveles de insulina, resistencia de insulina a través del modelo de evaluación homeostático de la resistencia a la insulina HOMA-IR y perfil lipídico. Adicionalmente, los estudios *postmortem* permitieron conocer la capacidad antioxidante protectora de la fracción en diferentes órganos diana de la enfermedad. Las dosis mencionadas fueron elegidas luego de descartar toxicidad a 500 mg/kg y tras evidenciar los mejores resultados terapéuticos en modelos (*in vivo*) previamente realizados y presentados en el capítulo 5.

4.1 Equipos y reactivos

Dieta rica en grasas (Test Diet® DIO Rodent Purified Diet 45% Energy from Fat-Red 58V8), dieta estándar (Lab Diet 5001), estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EE. UU.), equipo Accu-Chek Performa®, pentobarbital sódico (INVET, Colombia). Para determinar el estatus de estrés oxidativo se utilizaron los siguientes kits comerciales: superóxido dismutasa (SOD) (Ref. 19160) y catalasa (CAT) (Ref. CAT100) marca Sigma®, kit MDA (Ref. MAK085) de Sigma®. Para medir perfil de lipídico sérico: 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. Membranas para filtración 0,22 µm (CNW Technologies), lector de placas BERTHOLD®, ultracentrífuga Thermo Fisher Scientific® rotor 1H641, microcentrífuga (Hermle Z216, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen).

4.2 Animales

Este experimento fue aprobado en por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta 04/2017). El modelo de diabetes se llevó a cabo con ratones hembra CD-1 de 100-120 días de edad y un peso aproximado de 20-25 g, los cuales fueron provistos por la Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia. Los animales se mantuvieron desde el nacimiento a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Desde el inicio del 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 a voluntad. El peso corporal y la ingesta de alimentos se monitoreaba una vez por semana.

4.3 Inducción del modelo diabético

Desde el inicio hasta el final del experimento, los animales recibieron una dieta rica en grasas (Test Diet® DIO Rodent Purified Diet 45% Energy from Fat-Red 58V8) y agua ad libitum. Los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal se controlaron una vez por semana y todos los animales recibieron diariamente una dieta rica en grasas durante ocho semanas, al final de este período, se inyectó estreptozotocina (STZ) intraperitoneal (i.p.) a dosis de 40 mg/kg dos veces, con 5 días de intervalo entre cada uno. La STZ se disolvió en tampón de citrato (pH 4,5) y se aplicó una vez atemperado y estabilizada la preparación (Furman, 2015). Inmediatamente y durante las primeras 24 horas, los animales recibieron una solución de glucosa al 5% durante la noche para evitar la hipoglucemia inducida por fármacos. Transcurridos tres días después de la última administración de STZ, se midieron los niveles de glucosa en sangre (NGS) utilizando un equipo Accu-Chek Performa®, las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal a través de un corte mínimo. Para la clasificación de los animales diabéticos, aquellos ratones con NGS por encima de 150 mg/dL se consideraron aptos para la siguiente fase del experimento.

Una vez clasificados los animales de acuerdo con los NGS, aquellos ratones diabéticos se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes grupos (n = 6):

Grupo I: Control (animales normoglicémicos que recibieron solución salina como tratamiento)

Grupo II: CMC 0,5% + Tween 80 al 0,5% (vehículo),

Grupo III: Metformina 250 mg/kg (como fármaco de referencia de reconocida actividad antidiabética),

Grupo IV: Fracción BuOH (dosis: 50 mg/kg),

Grupo V: Fracción BuOH (dosis: 100 mg/kg)

Todos los tratamientos se administraron durante 21 días a través de una sonda orogástrica y semana a semana se realizó el monitoreo de los NGS. Al finalizar los tratamientos, se realizó un ensayo de sobrecarga oral de glucosa (SOG) con el fin de conocer la capacidad de cada uno de los grupos para regular los NGS a ese punto.

Una vez finalizado este periodo de tiempo, todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical previa inyección de pentobarbital sódico (60 mg/kg) (INVET, Colombia), (Janssen et al., 2004). Inmediatamente se obtuvieron muestras de sangre y se centrifugaron (3500 rpm durante 10 min) para recolectar el sobrenadante de suero con el fin de medir los niveles de insulina y realizar el análisis de perfil lipídico. Los órganos fueron retirados y lavados con tampón salino y conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ensayos posteriores y conservados en formalina al 10% para el análisis histopatológico.

4.4 Evaluación de indicadores de estrés oxidativo *post mortem*

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para determinar el estatus de estrés oxidativo de los individuos tratados fueron: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y peroxidación lipídica por la formación de malondialdehído (MDA).

4.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M o media \pm D.E y fueron analizados utilizando GraphPad Prism® software (versión 6, San Diego, CA). Se aplicaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de un test de Bonferroni o ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Dunnett según el caso. Para la homogeneidad de los datos se aplicó la prueba de Bartlett y se consideraron estadísticamente significativos aquellos datos con un valor de $p < 0,05$.

4.6 Resultados y discusión

4.6.1 Efecto de la FBUOH sobre la evolución del peso de ratones diabéticos

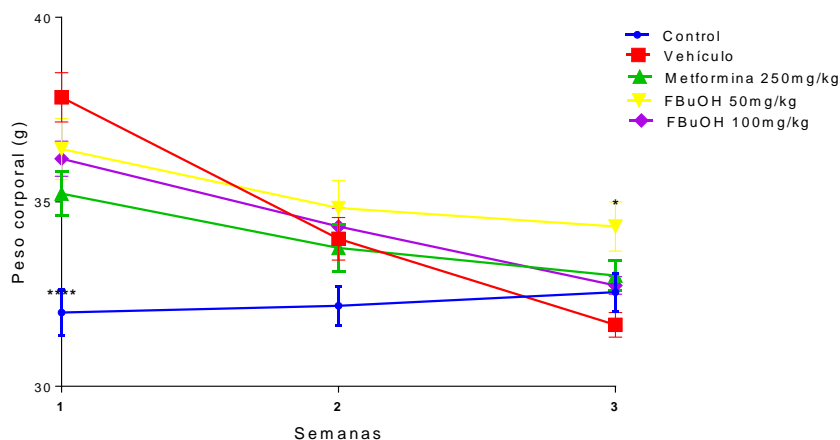


Figura 4-1. Efecto de FBUOH sobre el peso corporal en ratones diabéticos.

Datos expresados como media \pm D.E., (n=6). ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo vehículo al inicio de los tratamientos.

Como puede verse en la Figura 4-1, la pérdida de peso se hizo evidente desde el inicio de los tratamientos hasta después de la última administración de STZ. Sin embargo, los animales permanecieron con sobrepeso en comparación con el grupo normoglicémico (control). Este hallazgo es consistente con los de otros estudios, sin diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Lv et al., 2021). Solo el grupo diabético no tratado (vehículo) continuó perdiendo peso, lo que es consistente con el progreso de la enfermedad y con el daño causado por STZ, incluido el daño a los islotes pancreáticos, daño masivo de células β , inflamación sostenida, daño a otros órganos, y la producción insuficiente de insulina que resulta en hiperglucemia (Furman, 2015). En cuanto a Metformina y FBUOH, aunque estos grupos presentaron pérdida de peso, ésta no fue progresiva, y aunque los ratones no recuperaron peso sí se mantuvieron constantes, presentando una ventaja frente a los esperados procesos catabólicos propios del deterioro avanzado de la enfermedad.

4.6.2 Efecto de la FBuOH sobre los NGS de ratones diabéticos

La actividad hipoglicemiante de FBuOH se evaluó realizando el monitoreo de los NGS durante 3 semanas. El grupo de animales diabéticos que recibieron como tratamiento el vehículo alcanzó NGS de 400 mg/dL y se mantuvieron por encima de ese valor en el tiempo. Todos los animales diabéticos comenzaron el experimento con NGS máximos de 200 mg/dL (considerándose diabéticos aquellos que en ayuno presentaron NGS a partir de 150 mg/dL (Furman, 2015); sin embargo, como muestra la Figura 4-2, el grupo tratado con metformina mantuvo los niveles más bajos durante el tratamiento con diferencias estadísticas respecto al grupo vehículo y se observó un comportamiento similar con el grupo que recibió FBuOH a 100 mg/kg. La fracción FBuOH a dosis de 50 mg/kg también mostró diferencias significativas respecto al vehículo; alcanzando NGS de hasta 300 mg/dL. Aunque los NGS tendieron a aumentar con el paso del tiempo, se evidencia un efecto antihiperглиcemiante en comparación con el grupo vehículo. Este resultado ha sido atribuible al contenido del flavonoide rutina como flavonoide principal (Aragón et al., 2018).

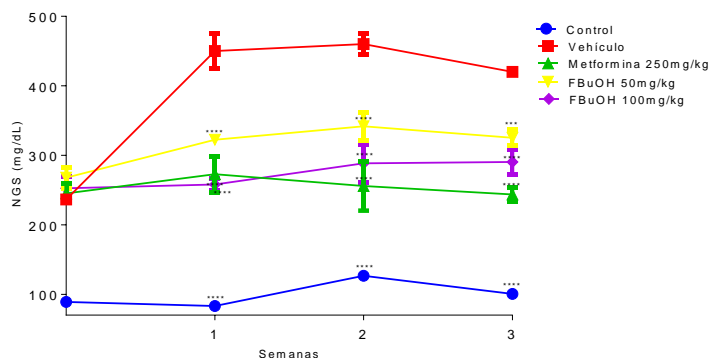


Figura 4-2. Efecto de la FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos.

Datos expresados como media \pm D.E., $n = 6$, ANOVA de dos vías, prueba post-hoc Bonferroni; **** $p < 0,0001$ respecto al grupo vehículo.

Estudios previos han demostrado que una vez el flavonoide rutina es ingerido, la mayor parte de esta molécula sufre una deglicosilación en el tejido intestinal, mediada por el efecto catalítico de la α -ramnosidasa y la β -glucosidasa y del microbiota intestinal. El

producto de estas reacciones es el flavonoide quercetina, que se conjuga con sulfato o ácido glucurónico en las vellosidades intestinales. Se demostró que la quercetina-3-O-sulfato (Q3OS) y la quercetina-3-O-glucurónido (Q3OG) son los principales metabolitos que se encuentran en el plasma cuando la rutina se administra por vía oral y que las moléculas de quercetina pueden fluir a la circulación sanguínea a través del flujo de salida de la membrana de la glicoproteína (Liu and Hu, 2007). Adicionalmente, se conoce que la matriz procedente del extracto de cálices de *P. peruviana* mejoró la absorción y biodisponibilidad oral de los conjugados (Domínguez Moré et al., 2021).

4.6.3 Efecto de la FBUOH sobre el perfil lipídico de ratones diabéticos

Los marcadores del perfil lipídico mostraron el efecto protector de FBUOH a ambas dosis; sin embargo, el grupo que recibió 100 mg/kg mostró el mayor efecto sobre los triglicéridos (TG), alcanzando un nivel más bajo incluso que el grupo tratado con metformina y los niveles lípidos de baja densidad de (LDL) fueron similares comparando los mismos grupos. Estas atenuaciones respecto a los otros grupos sugieren el efecto beneficioso de FBUOH sobre el perfil lipídico.

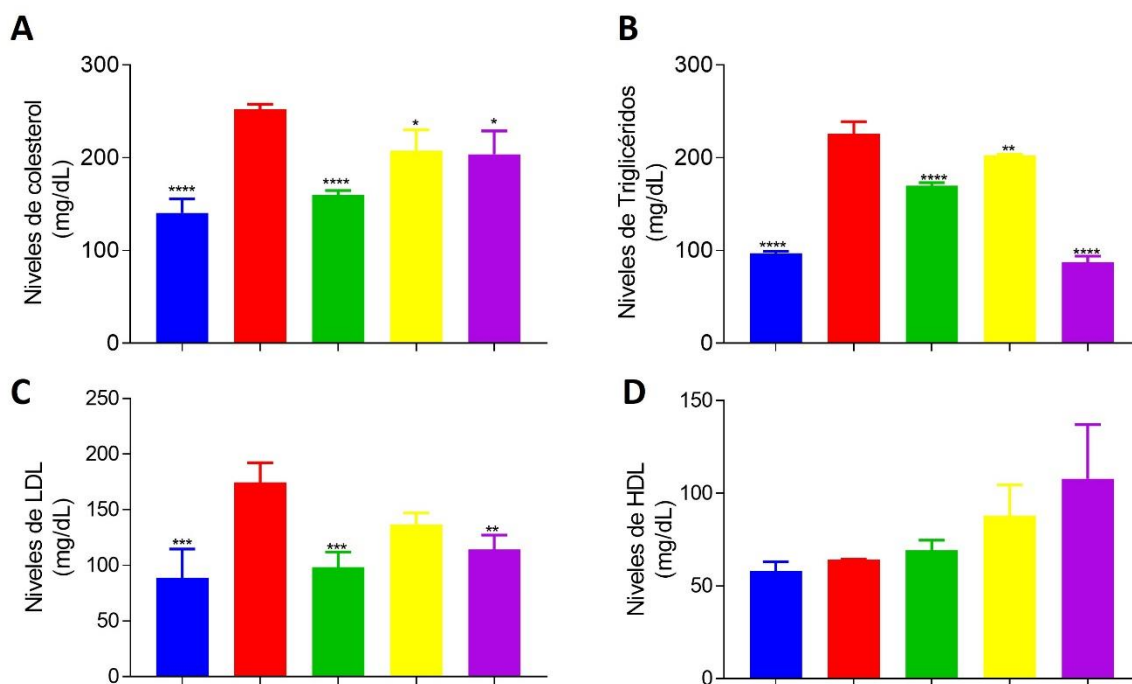


Figura 4-3. Efecto de la FBUOH sobre el perfil lipídico de ratones diabéticos.

Normoglicémicos (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/kg (verde), FBUOH 50 mg/kg (amarillo) y FBUOH 100 mg/kg (púrpura). Datos expresados como media \pm D.E, (n = 6). ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo de vehículo.

Los trastornos lipídicos se consideran altamente responsables de la mortalidad humana en la última década y los estudios realizados sobre los efectos de los compuestos polifenoles han demostrado beneficios al mejorar el estado hiperlipidémico (Imran et al., 2018). Estudios previos revelaron los efectos del ácido ferúlico al disminuir los niveles de TG y colesterol (de Paiva et al., 2013). Resultados similares de un experimento realizado en humanos corroboró los efectos antilipidémicos del té de hierbas zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe), estos efectos se relacionaron con la presencia de fenoles entre sus constituyentes (Tariq et al., 2016). Asimismo, la mejora del perfil lipídico en ratas jóvenes a las que se indujo resistencia a la insulina y luego fueron suplementadas con harina de cáscara de *Passiflora edulis* Var. Flavicarpa; fue atribuible a la presencia de un alto contenido de flavonoides (entre estos, quercetina-3-O-glucósido) y ácido cafeico (M J Goss et al., 2018). Adicionalmente, un derivado de la

rutina mostró atenuar los niveles de colesterol en ratas diabéticas por aloxano (Albu et al., 2013). El orujo de *P. peruviana* también disminuyó el colesterol total entre 23% y 35% en ratas y aumentó los niveles de colesterol HDL (Ramadan, 2012). Resultados similares se encontraron tratando ratas diabéticas por STZ con el orujo así como con el jugo de *P. peruviana* corroborando el efecto beneficioso sobre parámetros del perfil lipídico, estos efectos se relacionaron con la presencia de flavonoides y vitamina C (Darwish et al., 2020).

4.6.4 Efecto de la FBuOH sobre NGS durante una sobrecarga oral de glucosa (SOG) en ratones diabéticos

Al final de los tratamientos se realizó este experimento para determinar la capacidad de los animales para regular los niveles de glucosa posprandial. La Figura 4-4 muestra los NGS alcanzados entre el grupo metformina y el grupo tratado con FBuOH a 100 mg/kg en el minuto 60, con diferencias estadísticas con respecto al grupo vehículo. FBuOH 100 mg/kg mostró NGS más bajos en comparación con los otros tratamientos en el minuto 60.

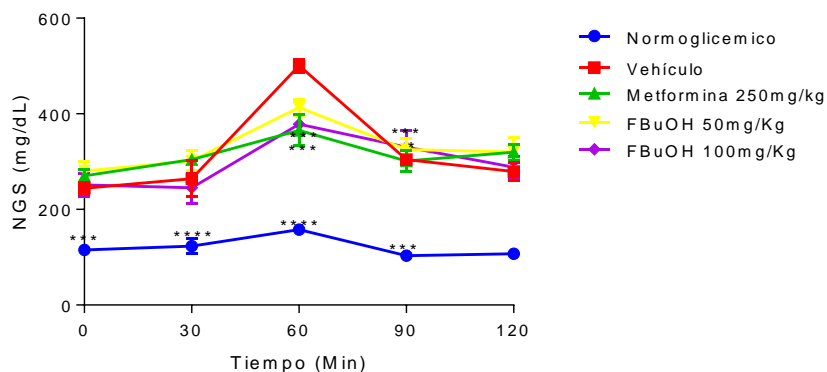


Figura 4-4. Efecto de la FBuOH durante una sobrecarga oral de glucosa en ratones diabéticos.

Datos expresados como media \pm E.E.M., n = 6 animales por grupo. ANOVA de dos vías, prueba post-hoc Bonferroni; ****p < 0,0001 respecto al grupo vehículo.

Varios estudios coinciden con los resultados presentados, considerando varios mecanismos de regulación de la glicemia; un modo de estos es la actividad inhibitoria

sobre diferentes carbohidrasas intestinales que provee el extracto de *P. peruviana* (Monzón Daza et al., 2021; Rey et al., 2015). Adicionalmente, los efectos sobre la α -amilasa han sido atribuibles a la presencia de flavonoides *O*-glicosilados como se identificó en FBUOH (Aragón Novoa et al., 2021). Otros mecanismos implicados son la captación muscular de glucosa y el secretagogo de insulina, atribuibles al contenido de rutina presente en *Musa x paradisiaca*. La fracción butanólica y las fracciones residuales acuosas de las hojas de *M. x paradisiaca* mejoraron la homeostasis de la glucosa durante una SOG en ratas con hiperglucemia transitoria; los autores identificaron la presencia de rutina como su principal compuesto (Kappet al., 2013). Investigaciones adicionales sitúan a los polifenoles como responsables de inducir la secreción de GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón) mediante la activación de GPCR (receptores acoplados a proteína G) para regular la señalización intracelular y modular su producción (Wang et al., 2021).

4.6.5 Efecto de la FBUOH sobre el índice de resistencia a insulina (HOMA-IR) en los ratones diabéticos

El índice HOMA-IR fue postulado por primera vez por Mathews y permite estimar la resistencia a insulina mediante el modelo homeostático de resistencia a insulina, conocido por su acrónimo (HOMA-IR) (Matthews et al., 1985). Como modelo matemático, incluye interacciones entre la insulina plasmática y las concentraciones de glucosa plasmática en ayuno; este método se ha utilizado ampliamente en investigación preclínica, así como en estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones (Qu et al., 2011).

Tabla 4-1. Efectos de FBUOH sobre algunos parámetros clínicos para determinar resistencia a insulina en ratones diabéticos

Tratamiento	Niveles de glucosa en ayuno (mg/dL)	Niveles de insulina en ayuno (μ UI/mL)	HOMA-IR
Normoglicémicos (Control)	113 \pm 5 ****	3.2 \pm 0.3 ****	1 \pm 0,1 ****
Vehículo	463 \pm 18	27 \pm 3,5	31 \pm 4,1
Metformina 250 mg/g	339 \pm 29 ****	18 \pm 3,9 ***	15 \pm 2,5 ****
FBUOH 50 mg/kg	335 \pm 37 ****	11 \pm 1,3 ****	9 \pm 0,4 ****
FBUOH 100 mg/kg	299 \pm 18 ****	11 \pm 1,4 ****	8 \pm 1 ****

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<0,0001 respecto al grupo vehículo.

De acuerdo con los resultados descritos en la Tabla 4-1, después de 21 días de tratamiento, la glucosa en ayuno, la insulina y el índice HOMA disminuyeron en los ratones que recibieron metformina, esto es lo esperado y de acuerdo con lo informado previamente (Ji et al., 2021). Adicionalmente, la dosis de 50 mg/kg de FBUOH mostró una disminución de 27,7% en los NGS en ayuno, 59,2% la insulina en ayuno y un 70% el HOMA-IR respecto al vehículo. El tratamiento de 100 mg/kg redujo un 35,4% la glucosa en ayuno, un 58,8% la insulina en ayuno y 73,2% HOMA-IR. Cabe destacar que la dosis mayor de fracción butanol muestra mejoría en los tres parámetros medidos respecto a la dosis de 50 mg/kg, lo que podría explicarse por la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos en mayor proporción. Otros extractos para los que se ha reportado la presencia de rutina y que han demostrado mejorar el índice HOMA-IR en ratas con diabetes tipo 2 inducida por dieta rica en grasas y dosis bajas de estreptozotocina son: extracto del fruto de *Capparis spinosa*, que también posee kaempferol-3-rutinósido (Assadi et al., 2021) así como el extracto etanólico de hojas de *Morus alba*, que contiene ácido clorogénico (Ji et al., 2021). Varios flavonoides han sido conocidos por su actividad insulinogoga, entre estos la quercetina y la rutina tanto en modelos *in vivo* como en *in vivo* (Unnikrishnan et al., 2013). Uno de los modos de acción que podrían estar implicados, es a través del aumento en la secreción de insulina por estímulo en la absorción de calcio en los islotes pancreáticos de rata (Kappel et al., 2013). Finalmente, estudios adicionales demostraron que 25 mg/kg o 50 mg/kg de rutina disminuyeron el índice HOMA-IR en ratas de veinte meses (Li et al., 2016). Podemos concluir que la

disminución de la resistencia a la insulina de FBUOH puede atribuirse a la presencia de rutina.

4.6.6 Efecto de la FBUOH sobre parámetros de estrés oxidativo (catalasa, peroxidación lipídica (MDA) y superóxido dismutasa) en los ratones diabéticos post tratamientos

La producción de EROs se considera un aspecto importante en el desarrollo del daño tisular en la diabetes mellitus (Mansuroğlu et al., 2015). En este estudio se evaluaron algunos parámetros de estrés oxidativo en ratones diabéticos para analizarlos, sumado a otros hallazgos observados durante los tratamientos y *post mortem*. Teniendo en cuenta que una causa importante del deterioro y la muerte de las células beta después del tratamiento con STZ se determina mediante la alquilación del ADN y la fragmentación del ADN, el autor sugiere la capacidad diabetogénica de la estreptozotocina para actuar como donante de óxido nítrico (NO) además de la presencia de otras EROs como superóxido y radicales hidroxilo para acelerar el daño de las células pancreáticas (Lenzen, 2008). Los productos naturales con actividad antioxidante se utilizan como coadyuvantes para el tratamiento de diversas enfermedades. Los frutos de *P. peruviana* han sido estudiados por su actividad antioxidante y efectos antidiabéticos (Lan et al., 2009) y se conocen en la medicina tradicional para tratar varias enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

En este estudio, el extracto de cálices de *P. peruviana* y sus fracciones, principalmente la fracción butanólica, mostró una notable actividad antioxidante en varios tejidos (plasma sanguíneo, homogeneizado de hígado, de cerebro y páncreas) así como actividad antiglicación. Como se observa adicionalmente al contenido del flavonoide rutina (compuesto mayoritario), la fracción mostró ser rica en varias moléculas que podrían estar actuando en sinergismo potencializando los efectos antioxidantes. Los derivados del ácido cafeico presentes en FBUOH habían mostrado actividad antioxidante en otros estudios, así mismo en otras plantas como es el caso de *Withania somnifera* se atribuyó su potencial antioxidante al contenido de derivados de withanólido (withanona) (Abu-Amscha et al., 1996; Devkar et al., 2021).

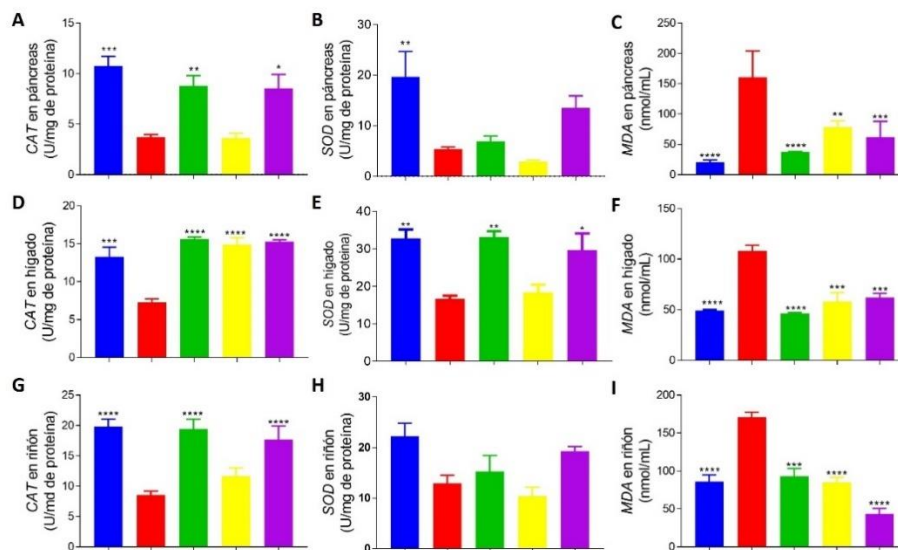


Figura 4-5. Efecto de FBuOH sobre parámetros de estrés oxidativo en ratones diabéticos.

Normoglicémicos (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/kg (verde), FBuOH 50 mg/kg (amarillo) y FBuOH 100 mg/kg (púrpura). Datos expresados como media \pm E.E.M, n=6. ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo de vehículo.

En hígado, en la figura 5d se observa que todos los grupos mantuvieron alta actividad de CAT con respecto al control negativo con niveles similares de actividad enzimática. La Figura 5e muestra la actividad residual de SOD en grupos tratados con FBuOH comportándose dependiente de la dosis, el grupo de FBuOH 100 mg/kg mostró un comportamiento similar al grupo tratado con metformina. Los niveles de MDA fueron estadísticamente diferentes en todos los grupos tratados respectivamente al grupo vehículo, no mostrando diferencia entre las dosis administradas de FBuOH, denotando la actividad protectora frente a la enzima por parte de la fracción butanólica de *P. peruviana* – figura 5f. a diferencia de otros órganos, el hígado está mucho mejor equipado para detener la formación de peróxido de hidrógeno por niveles de CAT en comparación con el páncreas (Lenzen, 2008). Hallazgos previos corroboran el efecto hepatoprotector de los cálices de *P. peruviana*, mediante la neutralización de ROS por las enzimas CAT y SOD en un modelo de inflamación hepática inducida por CCl_4 (Toro et al., 2013).

Por otra parte, en el riñón, como se aprecia en la figura 5G la CAT se muestra activa en todos los grupos que recibieron tratamiento, sin embargo, el grupo que recibió FBuOH 100 mg/kg mostró la mejor actividad de CAT. La figura 5H muestra la actividad de SOD, sin embargo, esta no presenta diferencias estadísticas respecto al vehículo. Los niveles de MDA en la figura 5I muestran la actividad protectora de todos los tratamientos en comparación con el grupo sin tratamiento. La importancia del efecto antioxidante sobre el riñón en un individuo diabético es el riesgo de pérdida estructural y funcional gradual, sin embargo, estos resultados permiten intuir la influencia protectora de los tratamientos sobre los individuos diabéticos. Hallazgos similares presentados en dos estudios diferentes, determinaron el efecto protector en riñón de ratas diabéticas con diabetes por STZ y tratadas con extractos de *P. peruviana* (Darwish et al., 2020; Mora et al., 2010). Un estudio realizado en ratas envejecidas (20 meses de edad) reveló el efecto del flavonoide rutina sobre la disfunción mitocondrial, aumentando la actividad de las bombas Na^+/K^+ ATPasa y Ca_2^+ -ATPasa, también aumentando el consumo de oxígeno y disminuyendo el estrés oxidativo sobre el retículo endoplasmático, esto se evidenció a través de la determinación del ATF3 (Factor 3 Activador de Transcripción) y proteína regulada por glucosa 78 (GRP78) encargada de regular la respuesta al estrés del retículo endoplasmático en los hígados de las ratas tratadas (Li et al., 2016).

4.7 Histopatología del páncreas, hígado y riñón de ratones diabéticos tratados con FBuOH

4.7.1 Páncreas

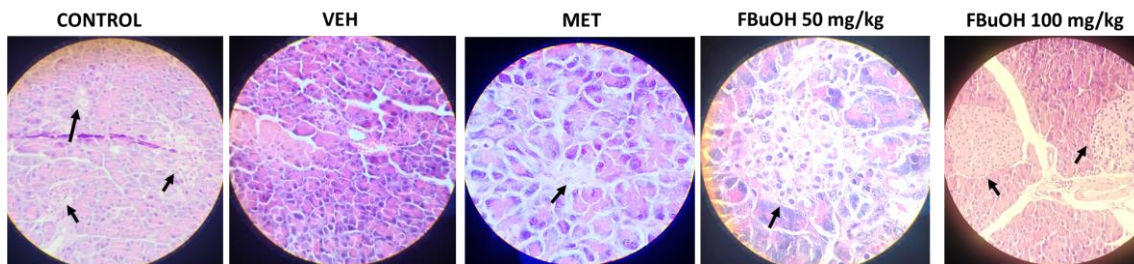


Figura 4-6. Efecto de FBuOH sobre islotes pancreáticos en ratones diabéticos tratados con FBuOH a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg.

Muestras teñidas con H&E y observadas con objetivo 40x.

Como se muestra en la Figura 4-6, los animales tratados con FBuOH mantuvieron la presencia de gránulos, especialmente observables en el grupo tratado con 100 mg/kg, así mismo con esta dosis se encontró conservación del parénquima pancreático, conservando la arquitectura que rodea a los islotes pancreáticos sin evidente hipertrofia. La dosis de 50 mg/kg protegió el tejido glandular, sin embargo, no preservó lo suficiente todo el compartimento de los islotes como para evitar la hipertrofia y aparente difusión del tejido β -pancreático. Cuando se compara el grupo diabético no tratado (vehículo) con los demás tratamientos, se denota la evidente ausencia de tejido glandular que suele ser consecuencia del daño tisular inicial, consecuencia de la inflamación e hipertrofia tisular. En el grupo de metformina se demostró la presencia de islotes de Langerhans, sin agrandamiento y manteniendo una arquitectura conservada en comparación con el grupo vehículo. Las observaciones presentadas hacen sentido con las respectivas respuestas alcanzadas en cuanto a los NGS, en las que la dosis de 100 mg/kg de FBuOH demostró mayor atenuación de los NGS a lo largo del tratamiento. Previamente, se ha demostrado que la STZ al ser un análogo estructural de la glucosa, se acumula en el transportador GLUT-2 a través del cual llega hasta las células β -pancreáticas, modificando su ADN fragmentándolo y destruyendo la señalización hacia la mitocondria y la funcionalidad celular. Dado este mecanismo, la STZ se ha utilizado como potente agente diabetogénico en modelos que buscan simular de forma aproximada la diabetes mellitus tras el efecto necrotizante de las células y su incapacidad para producir insulina (Lenzen, 2008). Estudios recientes demostraron la actividad protectora de una fracción de acetato de etilo obtenida a partir de los frutos de *Physalis peruviana* sobre los islotes de Langerhans a través de la disminución de la expresión de la proteína P53 encargada de inducir apoptosis y cuyo mecanismo es característico de varias enfermedades, por el efecto de ciertas moléculas de señalización (IL-1 β , el TNF- α y el IFN- γ). La respuesta ante el tratamiento se atribuyó al contenido de polifenoles presentes en esta fracción, entre estos derivados de ácido cafeoilquinico, Kaempferol y quercetina entre otros (Ezzat et al., 2021). Otros estudios demostraron la actividad protectora del flavonoide rutina en páncreas de ratas con diabetes inducida

por STZ, efecto dado por la actividad antirradicalaria que protegió las células β pancreáticas y a su vez, aumentó la funcionalidad en cuanto a la producción de insulina y el descenso de los NGS (Kamalakkannan & Prince, 2006); este efecto también fue demostrado en presencia de su aglicona quercetina en ratas diabéticas por STZ (Vessal et al., 2003).

4.7.2 Hígado

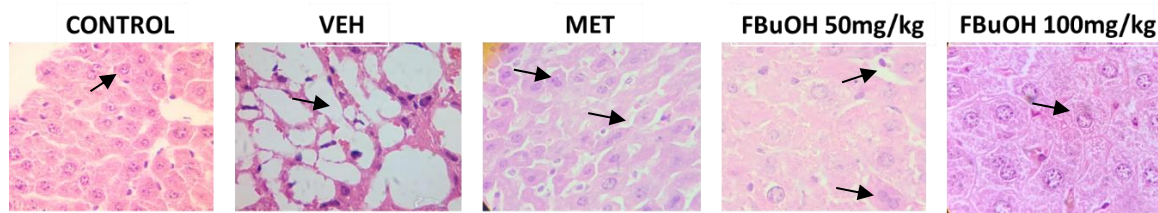


Figura 4-7. Efecto de FBuOH sobre tejido hepático de ratones diabéticos.

Muestras teñidas con H&E y observadas con objetivo 40x.

La Figura 4-7 muestra la diferencia entre el hígado de los animales a los que se les administró diferentes tratamientos. El grupo normal conservó una arquitectura normal, con cordones hepáticos definidos, mientras que el grupo vehículo presenta adipocitos hipertróficos, encontrándose compatible con una marcada esteatosis que es esperable al observar los niveles de triglicéridos alcanzados (numeral 4.6.2). El grupo que recibió metformina muestra una pequeña área blanca periférica del citoplasma correspondiente a depósitos de lípidos, más parecido al grupo FBuOH a 50 mg/kg; de hecho, FBuOH a 100 mg/kg mostró una mayor conservación de la estructura hepática con respecto al grupo vehículo, además no evidenció esteatosis y mostró una mejor respuesta con respecto a los niveles de triglicéridos (numeral 4.6.2). En general, los animales tratados con FBuOH, mostraron una presencia limitada de células binucleadas como un signo típico de regeneración que demuestra la respuesta protectora en el tejido hepático. Estos resultados concuerdan con informes previos que atribuyen la atenuación de la dislipidemia por el contenido de flavonoides en un extracto de *Sophora alopecuroides* L. en ratones con diabetes inducida por HFD y STZ (Lv et al., 2021). Un estudio adicional demostró el efecto de rutina sobre la acumulación

de lípidos en ratas viejas, disminuyendo el daño hepático y las complicaciones relacionadas como la resistencia a la insulina y a la inflamación crónica sistémica (Li et al., 2016).

4.7.3 Riñón

Una combinación entre estrés oxidativo, presencia de AGEs, el aumento en la expresión de marcadores inflamatorios y complicaciones vasculares se asocian con nefropatía en pacientes diabéticos (Luis-Rodríguez, 2012). De hecho, se han reportado presencia de subproductos oxidativos en zonas de mesangio renal así como la presencia de nódulos que evidencian lesiones por complicación diabetogénica (Poovitha et al., 2017).

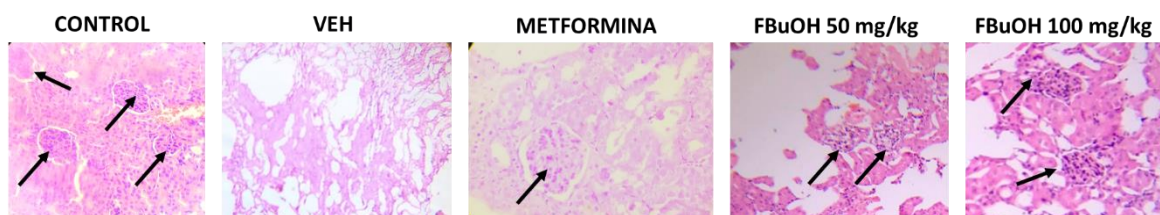


Figura 4-8. Efecto de FBuOH sobre tejido renal de ratones diabéticos.

Muestras teñidas con H&E y observadas con objetivo 40x.

En las imágenes presentadas en la Figura 4-8 se puede observar el grupo que recibió metformina como medicamento patrón en el que se hay presencia de glomérulo renal, con cápsula de Bowman conservada y presencia de tejido mesangial intraglomerular, estas estructuras permanecen intactas al igual que en el grupo no diabético y a los grupos que recibieron FBuOH en ambas dosis. Sin embargo, es de importancia denotar que a la dosis de 50 mg/kg se pierde algo de presencia de ovillos vasculares sin evidencia de tejido de sostén o con tejido conectivo escaso al compararse con el grupo normoglicémico. En el grupo vehículo no son observables glomérulos y el tejido conectivo presenta espacios tisulares. Estos resultados son coherentes con un estudio en el que ratas diabéticas por STZ y una dieta alta en grasas fueron tratadas con un extracto de cálices de *Hibiscus sabdariffa*, mejorando variables de enfermedad renal como: disminución de depósitos de grasa renal, presencia de AGEs, estrés oxidativo y disminución en la acumulación de colágeno, niveles de creatinina y albuminuria.

Dentro de la composición del extracto se evidenció el contenido de ácido 5-cafeoilquínico, derivados de feruloi, ácido 4-cafeoilquínico, ácido clorogénico, ácido cafeico, derivado de feruloilquínico, kaempferol-3-glucósido, derivados de quercetina entre otros; cabe resaltar que los flavonoides son considerados de gran importancia y complejidad en cuando a sus modos de acción, pero además han sido considerados por algunos autores como capaces de modular casi cualquier alteración fisiológica (Unnikrishnan et al., 2013)

4.8 Conclusiones

En los animales tratados con FBuOH se acentuaron los daños observables en diferentes órganos de interés (hígado, riñón, páncreas) conservando estructuras biológicas y funcionales respecto a los grupos no tratados. Por otra parte, FBuOH protegió frente a estrés oxidativo mejorando el perfil lipídico y la respuesta reguladora de NGS por parte del páncreas.

5. Capítulo: Efecto de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* en un modelo de síndrome metabólico (SM) inducido por consumo de fructosa a bajas dosis

El alto consumo de fructosa ha sido asociado con la enfermedad de hígado graso no alcohólico, esta enfermedad se considera una de las más frecuentes en el mundo y está fuertemente asociada a síndrome metabólico. Dentro del metabolismo de la fructosa, cabe recordar que su consumo excesivo promueve la lipogénesis, la acumulación intrahepática de lípidos y la inflamación (Lim et al., 2010). Adicionalmente, la fructosa se metaboliza en el hígado generando a su vez otros metabolitos como: glucosa, ácido úrico, lactato, ácidos grasos libres, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). (Goss et al., 2018). Estudios previos realizados en UNIVALI (Brasil) demostraron que, en ratas administradas con dosis bajas de fructosa en agua de bebida, se generaban alteraciones como hígado graso, hipertrofia de adipocitos, esteatosis, resistencia a insulina, disturbios en el perfil lipídico aumentando triglicéridos, colesterol y LDL. Así mismo, la patogénesis de este síndrome permite evidenciar comportamientos sobre marcadores de inflamación asociados a los altos depósitos grasos y el estrés oxidativo.

En este capítulo se presenta información relevante frente a la respuesta al tratamiento con FBUOH en dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg en ratones con síndrome metabólico inducido por consumo de fructosa en agua de bebida durante 12 semanas, con el fin de conocer el efecto de FBUOH sobre la evolución de la enfermedad, teniendo en cuenta parámetros como: niveles de glucosa, HOMA-IR, perfil lipídico, peso, características histopatológicas (esteatosis hepática e hipertrofia de adipocitos) y expresión de citoquinas proinflamatorias.

5.1 Equipos y reactivos

Equipo Accu-Chek Performa[®], pentobarbital sódico (Invet, Colombia), Ketamina 50 (Holliday, Colombia), fructosa y glucosa grado reactivo.

Para medir perfil lipídico sérico: Los marcadores de perfil lipídico: colesterol total (CT), triglicéridos (TG), lipoproteínas de baja densidad (LDL) fueron medidos utilizando kit comercial (biotécnica, Varginha, MG, Brasil). Membranas para filtración 0,22 μm (CNW Technologies), lector de placas BERTHOLD[®].

5.2 Animales

Se utilizaron ratones CD-1, hembras de entre 6-8 semanas de edad y pesos entre 20-25 g, fueron distribuidos en grupos de 8 individuos. Los animales fueron mantenidos a temperatura ambiente cercana a los $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos fueron aprobados previamente por el Comité de Ética local de la Universidad de Vale Do Itajaí, Brasil, de acuerdo con el protocolo número 014/151 y de acuerdo con las directrices de la Sociedad Brasileña de Ciencias de los Animales de Laboratorio para el cuidado y uso adecuado de los animales de experimentación.

Para los análisis histopatológicos, el hígado y páncreas se extrajeron rápidamente y se fijaron en formalina al 10 %, se embebieron en parafina en el corte respectivo y se tiñeron. Las muestras se examinaron con un microscopio BA-9000L (Osaka, Japón).

5.3 Inducción al modelo de síndrome metabólico

Los animales recibieron alimentación convencional y el agua de bebida fue sustituida por agua con fructosa al 20% durante 15 semanas y colocada en bebedero para consumo *ad libitum*. Dos veces por semana se monitoreaban: peso, consumo de agua y alimento y una vez por semana se midieron los NGS. Las muestras de sangre fueron colectadas

de una de las venas caudales y los niveles de glucosa en sangre fueron medidos con un glucómetro Accu-Check Performa®.

Al final de la semana 12, se realizaron las siguientes pruebas: SOG, niveles de colesterol, triglicéridos, LDL y HDL con el fin de clasificar los animales con evidencia de síndrome metabólico que fuesen candidatos para iniciar los siguientes tratamientos.

Grupo I: Vehículo (CMC 0,5% - Tween 80 al 0,5%)

Grupo II: Fructosa 20% + vehículo

Grupo III: Fructosa 20% + Metformina (250 mg/kg)

Grupo IV: Fructosa 20% + FBuOH 100 mg/kg

Grupo V: Fructosa 20% + FBuOH 300 mg/kg

A la semana 15 los tratamientos fueron finalizados y se realizaron últimas pruebas de SOG. Los animales fueron sacrificados por decapitación, previa medicación con Ketamina (80 mg/kg) / Xilacina (10 mg/kg) i.p (Levin-Arama et al., 2016). Inmediatamente fueron colectadas muestras de sangre para posterior análisis de insulina y perfil lipídico; los órganos fueron colectados, lavados, pesados y almacenados para posterior observación histopatológica.

5.4 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm E.E.M o media \pm D.E; y fueron analizados utilizando GraphPad Prism® software (versión 6, San Diego, CA). Se aplicaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni o ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Dunnett según el caso. Para la homogeneidad de los datos se aplicó la prueba de Bartlett y se consideraron estadísticamente significativos aquellos datos con un valor de $p < 0,05$.

5.5 Resultados y discusión

5.5.1 Efecto de la FBUOH sobre el consumo de agua, alimento y ganancia de peso en ratones con Síndrome Metabólico

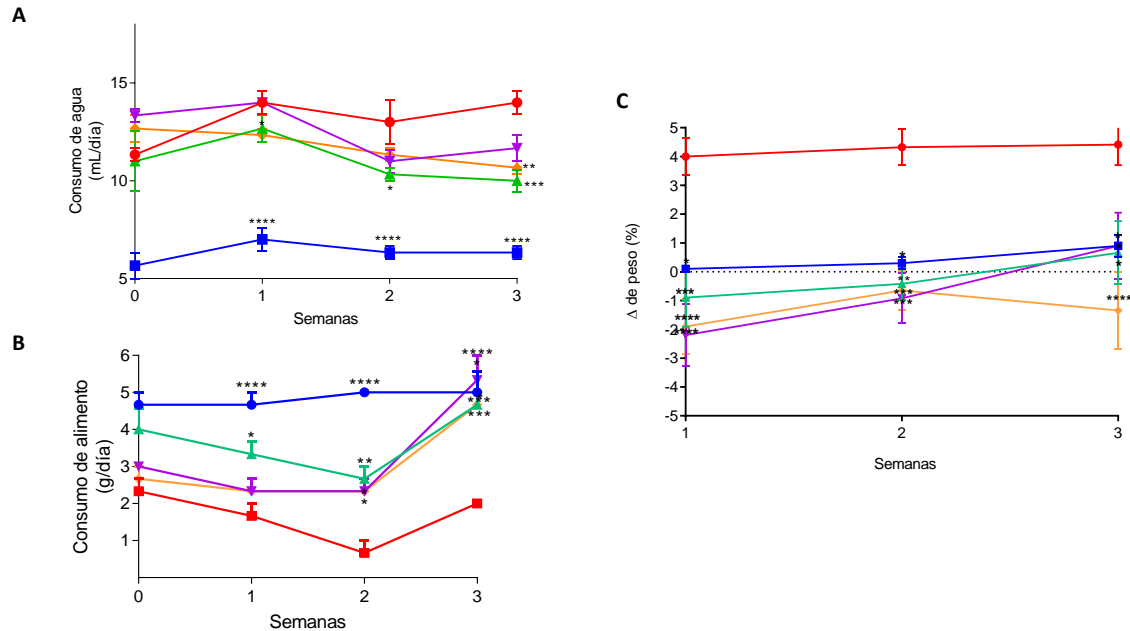


Figura 5-1. Efecto de FBUOH sobre el consumo de agua, consumo de alimento y ganancia de peso en ratones con síndrome metabólico.

Normoglicémico (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/kg (verde), FBUOH 100 mg/kg (púrpura), FBUOH 300 mg/kg (naranja).

Datos expresados como media \pm E.E.M, n = 10 animales por grupo. ANOVA de dos vías, prueba post-hoc Bonferroni; ****p < 0,0001 respecto al grupo vehículo.

Como es observable en las figuras A y B, los animales que recibieron fructosa en el agua de bebida siempre tendieron a consumir más volumen que el grupo control. Sin embargo, en la segunda y tercera semanas se observó que se disminuyó el consumo respecto al grupo que recibió fructosa, pero no fue tratado. Este comportamiento presentó algo similar a una compensación respecto al consumo de alimento el cual en animales tratados se tendió a ver aumentado también a partir de la segunda semana sin superar el consumo que mostró el grupo de animales que no consumieron fructosa. Este comportamiento se ha reportado en estudios anteriores en los que los animales tienden a consumir más la solución con fructosa que la dieta seca a base de concentrado,

esto se ha asociado a mayor captación de energía en el agua con fructosa y a mayor palatabilidad (Miranda et al., 2019; Ramos et al., 2017). Dentro de la relación entre obesidad, inflamación y dolor, se debe considerar aquellos casos en los que se ha observado animales con signos de obesidad y/o prediabetes que presentan estatus de alodinia (Cooper et al., 2017) y que en condiciones experimentales han mostrado disminución en el consumo de alimento y mayor deterioro en general. Esto indica que el consumo de alimento constante en niveles muy similares a los del grupo que no se administró con fructosa es un buen indicativo de mantenimiento del apetito en condiciones casi normales. Así mismo en cuanto a la ganancia de peso (fig. C), los animales que recibieron FBUOH, especialmente a dosis de 300 mg/kg mostraron menos riesgo de obesidad cuando se comparó con el grupo vehículo. Es importante mencionar que los adipocitos se encargan de producir numerosas adipocinas, estas interactúan y están involucradas en la fisiopatología de la resistencia a la insulina, así como de las alteraciones metabólicas consecuentes. Existen adipocinas proinflamatorias y otras que modulan y son consideradas antiinflamatorias. Cuando este equilibrio se rompe, la inflamación persistente termina generando resistencia a la insulina, es cuando se habla del síndrome metabólico y se relacionan todas las alteraciones allí presentadas sobre todo con la obesidad que a su vez se suma a diferentes alteraciones orgánicas que van complicando el cuadro a medida que pasa el tiempo (Sánchez et al., 2010). Una adipocina muy importante en la obesidad es la leptina la cual se encarga de regular el peso corporal a través de la regulación del apetito, suprimiendo la ingesta de alimentos y aumentando el gasto energético a través del eje hipotálamo-pituitario-gonadal. Sin embargo, al aumentar el tamaño de los adipocitos también aumentan las cantidades de leptina circulante generándose hiperleptinemia, hiperuricemia e hiperinsulinemia, siendo estos, signos característicos en pacientes con resistencia a insulina. Estudios realizados en un modelo de obesidad en ratas por consumo de fructosa, demostraron que los flavonoides rutina y quercetina disminuyeron la hiperleptinemia así como la producción de leptina en adipocitos, adicionalmente las ratas que recibieron estos tratamientos también mostraron atenuación sobre el perfil lipídico (Li et al., 2008). Esta información apoya los resultados aquí presentados en donde el modelo de ratones con SM respondió de manera positiva a FBUOH y, teniendo en cuenta que entre los compuestos presentes se encuentran estos dos compuestos, podemos intuir que este

modo de acción estaría apoyando la respuesta observada en la que los animales tratados mantienen su peso regulándose el consumo de alimento y la ganancia de peso por actividad sobre la producción de leptina.

5.5.2 Efecto de la FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre de en ratones con Síndrome Metabólico

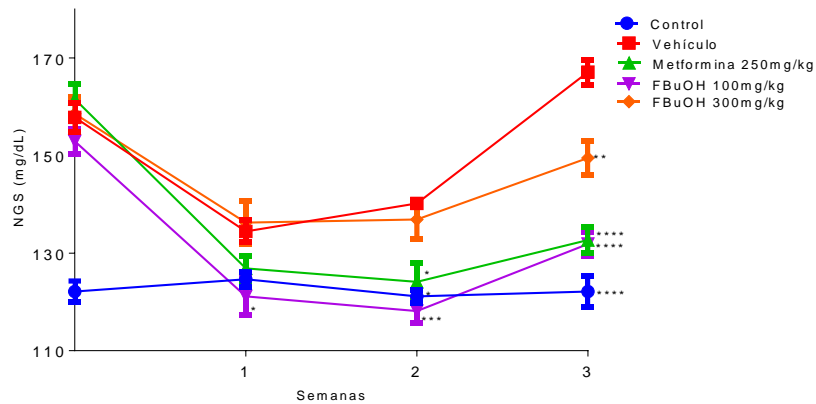


Figura 5-2. Efecto de la FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones con Síndrome Metabólico.

Normoglicémico (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/kg (verde), FBuOH 100 mg/kg (púrpura), FBuOH 300 mg/kg (naranja).

Los datos se expresan como media \pm D.E., $n = 6$ animales por grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante un ANOVA de dos vías después de la prueba de Bonferroni; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo vehículo.

Como se evidencia en la gráfica, los animales que recibieron el medicamento patrón (metformina) así como el grupo que recibió la FBuOH en dosis 100 mg/kg presentaron un comportamiento en los NGS mucho más disminuidos con respecto al grupo vehículo. Incluso, en el caso de FBuOH este grupo tendió a presentar NGS más bajos que el grupo control a partir de la primera semana de seguimiento y mantenida durante la segunda semana. Al final de la semana 3 se observa en todos los grupos una elevación común en los NGS que podría estar relacionada con alteraciones asociadas a estrés ambiental.

Un aspecto que causa especial atención es el comportamiento de la FBuOH a dosis de 100 mg/kg mostrándose más eficiente en cuanto al descenso de los NGS frente al tratamiento a 300 mg/kg. Este comportamiento en este experimento podría estar dado por un efecto de hormesis en el que se da una respuesta bifásica, a bajas concentraciones se producen efectos estimulantes o benéficos y a altas concentraciones se obtienen efectos inhibitorios o incluso tóxicos (Mattson, 2008). Estudios previos realizados en modelo de ratas con DMT II por administración de fructosa al 10% más estreptozotocina, fueron tratadas con una fracción butanólica de *Parkia biglobosa* a dosis de 150 mg/kg y a 300 mg/kg, siendo el tratamiento de menor dosis (150 mg/kg) el que demostró un efecto anti DMT II por estímulo de las células β -pancreáticas para la producción de insulina (Ibrahim et al., 2016).

5.5.3 Efecto de la FBuOH durante una sobrecarga oral de glucosa (SOG) en ratones con Síndrome Metabólico

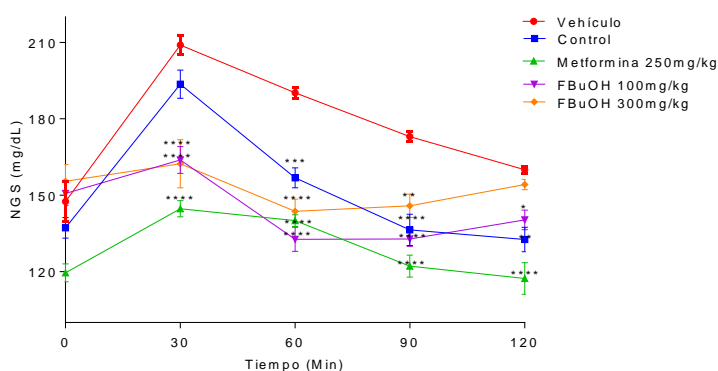


Figura 5-3. Efecto de FBuOH sobre los niveles de glucosa en sangre de ratones con Síndrome Metabólico, sometidos a sobrecarga oral de glucosa (SOG).

Datos expresados como media \pm E.E.M, $n = 6$ animales por grupo. ANOVA de dos vías, prueba post-hoc Bonferroni; **** $p < 0,0001$ respecto al grupo vehículo.

Estudios realizados en este modelo demuestran que el consumo de fructosa genera intolerancia a la glucosa por posibles daños en las células β -pancreáticas y a partir de este, menor masa de tejido endocrino y menor producción de insulina (Miranda et al., 2019). En los resultados obtenidos, se evidencia que ambas dosis de FBuOH detuvieron o atenuaron el pico en los NGS presente en el minuto 30 para todos los tratamientos; los grupos tratados con la FBuOH al igual que el grupo que recibió metformina

alcanzaron NGS menores y estadísticamente significativos respecto al grupo vehículo y manteniéndose el mismo comportamiento en todos los puntos hasta el final del experimento.

5.5.4 Efecto de la FBUOH sobre el perfil lipídico en ratones con Síndrome Metabólico

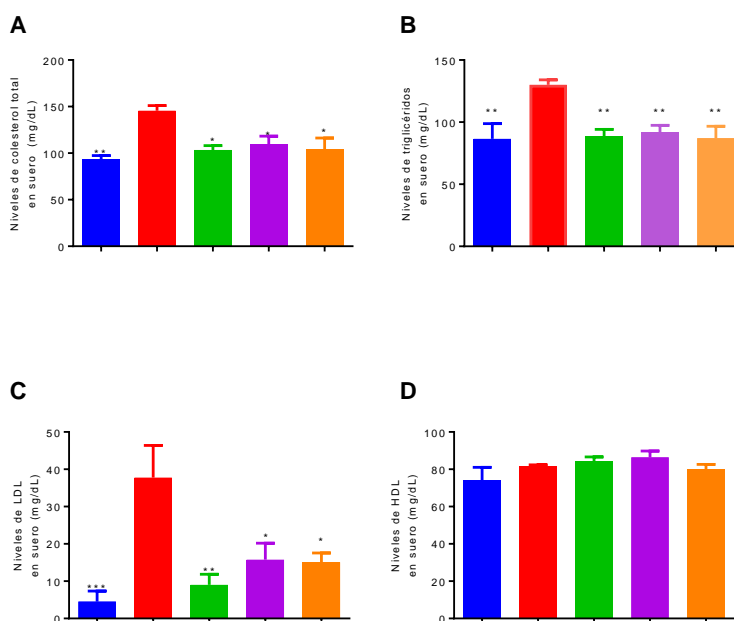


Figura 5-4. Efecto de la FBUOH sobre el perfil lipídico de ratones diabéticos.

Normoglicémicos (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/kg (verde), FBUOH 100 mg/kg (púrpura) y FBUOH 300 mg/kg (naranja) Datos expresados como media \pm DE, (n = 6). ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ respecto al grupo de vehículo.

Este modelo permite evidenciar aumentos de CT y TG en animales no tratados cuando se administra fructosa entre 10 y 25% causando alteraciones en el metabolismo de lípidos en general (Miranda et al., 2019). Los resultados observados confirmaron que FBUOH a ambas dosis tuvieron un efecto hipolipemiante respecto a los demás grupos cuando se midieron en sangre con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo no tratado (Shi et al., 2017; Tang et al., 2012). El efecto hipolipemiante de la quercetina en este sentido está atribuido al mecanismo de absorción de la rutina en el

que una vez administrado vía oral, esta molécula sufre hidrólisis por acción de enzimas intestinales β -glucosidasa y α -ramnosidasa y es separada de su glicósido. El producto de esta reacción es la quercetina la cual posteriormente se conjuga en los enterocitos con ácido glucurónico o sulfato y son estos conjugados los compuestos que en su mayoría se logran detectar en plasma sanguíneo una vez se ha administrado la rutina por vía oral (Domínguez Moré et al., 2021). Una de las principales preocupaciones en el síndrome metabólico y diabetes son las alteraciones del perfil lipídico ya que aquellos individuos con niveles altos de colesterol total (CT) y colesterol de baja densidad (LDL) son más propensos a tener complicaciones coronarias dada la múltiple activación de diferentes proteínas proinflamatorias como se observa en el siguiente esquema:

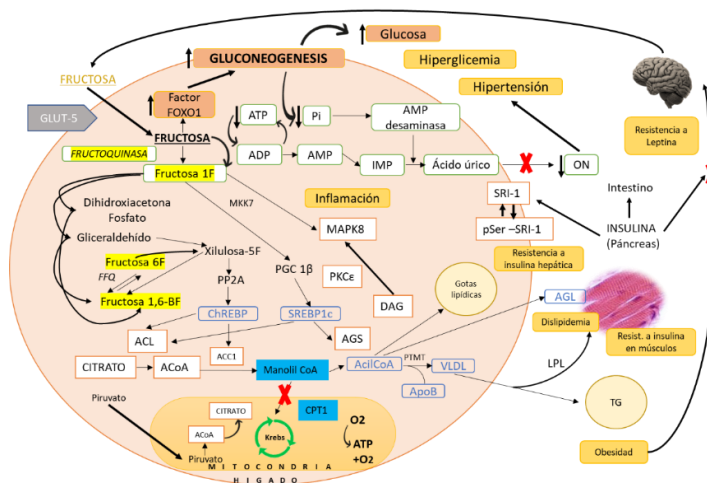


Figura 5-5. Metabolismo hepático de la fructosa.

Modificado de (Lim et al., 2010).

Dentro del esquema se explica cómo el exceso de fructosa induce el agotamiento de fosfato dependiente del sustrato; con esto aumenta la síntesis del ácido úrico y se disminuye el NO (verde) y la enzima óxido nítrico sintasa a nivel del endotelio vascular generándose a nivel clínico hipertensión arterial. Por otra parte, la presencia de citrato en exceso es un sustrato para que se genere lipogénesis (naranja) y la alta producción de malonil-CoA inhibe el proceso de la β -oxidación (rojo). La formación de gotitas de lípidos hepáticos y el acúmulo de estos lípidos genera como consecuencia un estatus de esteatosis en el que la activación de MAPK8 y PKC ϵ favorecen la fosforilación de serina de IRS-1 y la resistencia a la insulina a nivel hepático, evidenciándose hiperinsulinemia

y depósitos de sustrato en la grasa (amarillo); la salida de ácidos grasos libres, generan la formación de VLDL y a su vez resistencia a insulina en el músculo (azul claro). El incremento en la producción de FOXO1, que causa la formación de glucosa *de novo* e hiperglucemia (rosa) así como e hiperinsulinemia en el sistema nervioso central, antagoniza la acción de leptina a nivel central, aumentando la ingesta (Unnikrishnan et al., 2013).

5.5.5 Efecto de la FBuOH sobre el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) en ratones con Síndrome Metabólico

De acuerdo con los resultados descritos en la Tabla 5-1, después de 21 días de tratamiento, la glucosa en ayuno, la insulina y el índice HOMA-IR disminuyeron en los ratones con SM tratados con metformina, dado que es el grupo patrón los resultados eran esperados (Ji et al., 2021). En cuanto a los tratamientos de FBuOH, la dosis de 100 mg/kg mostró un mejor comportamiento disminuyendo hasta un 52% el HOMA-IR, 21% en los NGS en ayuno, un 39% respecto al vehículo.

Tabla 5-1. Efectos de FBuOH sobre algunos parámetros clínicos para determinar resistencia a insulina en ratones con Síndrome Metabólico

Tratamiento	Niveles de glucosa en ayuno (mg/dL)	Niveles de insulina en ayuno (μ UI/mL)	HOMA-IR
Normoglicémicos (Control)	112 \pm 3 ^{***}	9,4 \pm 0,3 ^{****}	1 \pm 0,2 ^{****}
Vehículo	173 \pm 8	17,2 \pm 2,2	7,3 \pm 0,9
Metformina 250 mg/kg	134 \pm 13 ^{***}	11,1 \pm 0,3 ^{****}	3,7 \pm 0,3 ^{****}
FBuOH 100 mg/kg	137 \pm 8 ^{**}	10,5 \pm 1,5 ^{****}	3,5 \pm 0,3 ^{****}
FBuOH 300 mg/kg	152 \pm 5 [*]	12,8 \pm 2,6 ^{**}	4,8 \pm 0,8 ^{**}

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 tratamiento a dosis de 300 mg/kg también mostró reducción sobre las variables, aunque en menor medida respecto a la menor dosis probada. A 300 mg/mL se redujo

un 12,1% la glucosa en ayuno, un 25,6% los niveles de insulina en ayuno y 34,2% HOMA-IR. Los resultados obtenidos en este biomodelo demostraron congruencia con los obtenidos en este sentido, en el modelo de HFD-STZ a dosis bajas repetidas las cuales se describen en el numeral 4.6.5 y se resalta que la dosis de 100 mg/kg también mostró una actividad más promisorio frente a resistencia a insulina.

Otros extractos de los que se ha reportado la presencia de rutina y que han mostrado mejorar el índice HOMA-IR en ratas con diabetes tipo 2 inducida por dieta rica en grasas y dosis bajas de estreptozotocina son: Extracto del fruto de *Capparis spinosa*, en el cual se encontró kaempferol-3-rutinósido (Assadi et al., 2021) así como el extracto etanólico de hojas de *Morus alba*, que contiene ácido clorogénico (Ji et al., 2021). Dentro de los modos de acción que podrían estar implicados, se ha informado previamente que el flavonoide rutina disminuye la glucemia al aumentar la secreción de insulina y estimular la absorción de calcio en los islotes pancreáticos de rata (Kappel, et al., 2013). Finalmente, otros estudios demostraron que 25 mg/kg y 50 mg/kg de rutina disminuyeron el índice HOMA-IR en ratas de veinte meses (Li et al., 2016). Podemos concluir que la disminución de la resistencia a la insulina de FBuOH puede atribuirse a la presencia de rutina.

5.5.6. Histopatología de adipocitos, hígado y páncreas de ratones con síndrome metabólico tratados con FBUOH

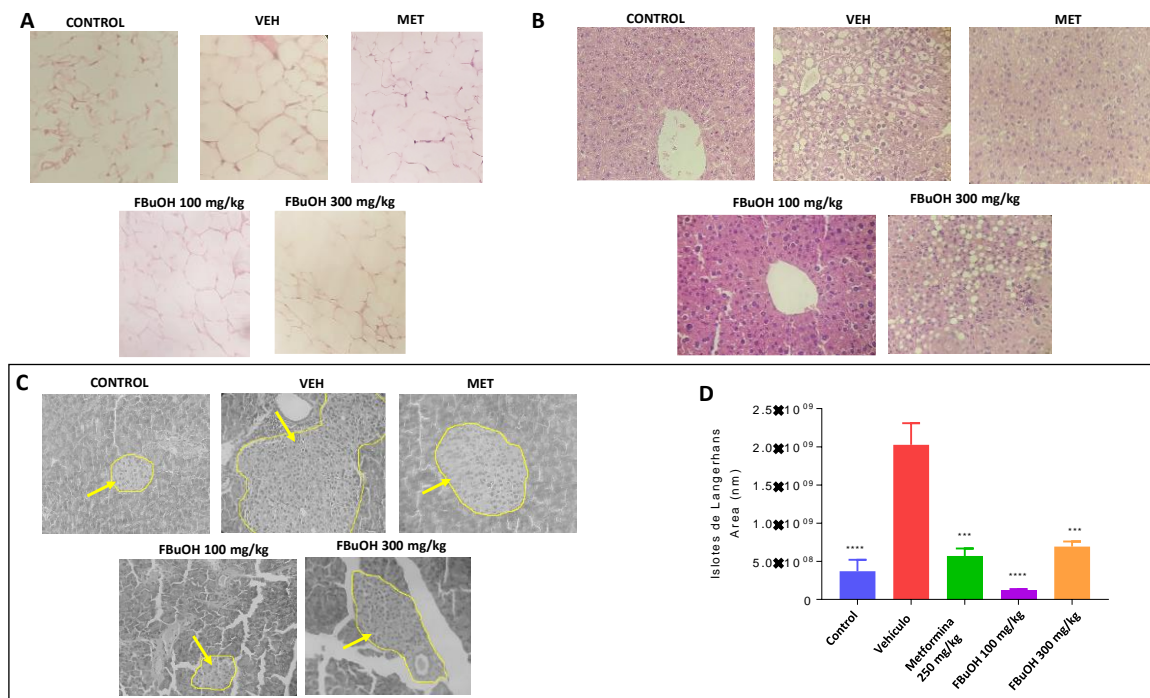


Figura 5-6. Efecto de la FBUOH sobre adipocitos, hígado y páncreas.

Muestras teñidas con H&E y observadas con objetivo 40x. A) Lípidos hepáticos (adipocitos); B) Tejido hepático; C) Tejido pancreático; D) Área islotes de Langerhans.

Las microfotografías muestran imágenes de adipocitos presentes en grasa visceral (A) se observa un grupo vehículo con evidente hipertrofia a comparación con los demás tratamientos. En general, ambas dosis de FBUOH mostraron actividad protectora siendo el grupo control y la dosis de 100 mg/kg los tratamientos más eficaces para prevenir la hipertrofia de tejido graso. En tejido hepático (B), el grupo control (normoglicémicos), metformina y FBUOH a 100 mg/kg mostraron una alta similitud, conservando su arquitectura sin evidencia de acumulaciones lipídicas (esteatosis) y sin agregados linfoides observables. La imagen del grupo con SM que no recibió tratamiento (vehículo), muestra evidencia de cambios macrovacuolares de lípidos con degeneración grasa; se observan células multinucleadas que podrían ser indicativo de un posible mecanismo de regeneración en curso. Adicionalmente, el grupo que recibió

FBuOH a 300 mg/kg presentó focos de esteatosis con presencia de células binucleadas, pero en menor medida que el grupo del vehículo.

5.7. Conclusiones

FBuOH logró atenuar las alteraciones relacionadas con los parámetros de perfil lipídico, así como la acumulación de lípidos a nivel hepático, hipertrofia de adipocitos y obesidad. Como indicaron los resultados presentados en el estatus de estrés oxidativo en el modelo de diabetes por STZ/HFD, FBuOH mostró ser un potente anti radicalario, lo que se asocia también a los resultados obtenidos para este modelo confirmado por la disminución en las lesiones en órganos observados por histopatología y en la evidente regulación vista en cuanto a los NGS del modelo de SM.

6. Capítulo: Posibles mecanismos de acción de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana*

Dentro de los disturbios presentados en el síndrome metabólico, la inflamación juega un papel crucial en el deterioro del paciente que lo padece. Cuando los adipocitos se hipertrofian y proliferan de forma desmedida generan la activación de células leucocitarias (neutrófilos, eosinófilos, linfocitos) y a su vez la liberación de citoquinas proinflamatorias como por ejemplo TNF- α e IL-6 así como la disminución de otras citoquinas que hacen el efecto contrario en condiciones normales como “antinflamatorias” (Rodríguez López et al., 2017). Por lo anterior, era relevante conocer los niveles de estos marcadores de inflamación en el paciente con SM, previamente tratados con FBuOH y cuyos datos se presentaron en el capítulo anterior. Adicionalmente, en el modelo de células RAW 264.7 tratadas con FBuOH, la producción de TNF- α e IL-6 fue inducida por la presencia de un lipopolisacárido (LPS) y determinada por espectrofotometría. De esta forma se pudo comprobar la actividad de FBuOH en este segundo modelo. Otros parámetros se tuvieron en cuenta en células RAW 264.7 como la viabilidad celular y la formación de nitritos proporcionando información acerca de la toxicidad y actividad antirradicalaria de la fracción.

Como ensayo complementario se aislaron adipocitos de animales con SM que recibieron los diferentes tratamientos para determinar la influencia de estos sobre el tamaño de los lípidos hepáticos.

Dicho así, este capítulo presenta análisis pertinentes para conocer si la fracción butanólica modula la inflamación de individuos con SM, y abre una puerta de entrada para estudiar a profundidad los detalles mecánicos de acción.

6.7. Equipos y reactivos

La línea celular RAW 264.7 adquirida en el Banco de Células de Río de Janeiro (BCRJ, Río de Janeiro, RJ, Brasil), MTT (Sigma-Aldrich), microplaca de 96 pocillos (Costar®), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), kit IL-6 de ratón DuoSet® Elisa (Mouse TNF- α #DY-410) (Minneapolis, EE. UU.), kit x TNF- α de ratón DuoSet® Elisa DY410 (Minneapolis, EE. UU). Cloroformo, metanol. Para medir triglicéridos y colesterol se utilizaron kits comerciales (Biotécnica, Varginha, MG, Brasil).

6.8. Aislamiento de lípidos hepáticos

La extracción se realizó según la metodología Folch (FOLCH et al., 1957). Se homogeneizaron 1,25 g de tejido hepático de animales con síndrome metabólico previamente inducido (*ver cap. 5*) durante 3 minutos con 1,9 mL de cloroformo/metanol (1:2). Luego se agregaron 400 μ L de metanol y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se agregaron 800 μ L de cloroformo y 640 μ L de NaCl al 0,73%; la mezcla se centrifugó una vez más a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la muestra se lavó 3 veces con solución de Folch: 3% cloroformo, 48% metanol, 47% agua 2% de NaCl al 0,2%). Finalmente, las muestras se secaron a 37° C. Para la cuantificación de lípidos las muestras se resuspendieron en isopropanol y para medir Chol y TG se utilizó un kit enzimático comercial.

6.9. Determinación de TNF- α e IL-6 en homogenado de hígado y células RAW 264.7

Se siguieron las indicaciones del fabricante del kit para determinar los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en homogeneizado de hígado, recolectado *post mortem* de animales con SM, previamente tratados con 100 mg/kg y 300 mg/kg. En células RAW, los niveles de TNF- α e IL-6 fueron inducidos por lipopolisacáridos (LPS) y las muestras fueron tratadas con FBUOH a 1, 10 y 100 μ g/mL y analizadas según la recomendación del kit comercial.

6.10. Cultivo de células RAW 264.7

Una vez adquirida la línea celular de macrófagos en el Banco de Células de Río de Janeiro (BCRJ, Río de Janeiro, RJ, Brasil), las células se mantuvieron en un medio alto en glucosa que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) con penicilina y estreptomina (100 UI/mL y 100 μ g/L, respectivamente) en condiciones de 5% de CO₂ y 37°C y, luego, se colocaron en una microplaca (50.000 células/pocillo) manteniéndolas en las mismas condiciones de CO₂ y temperatura 21 horas antes de ser ensayadas.

6.11. Determinación viabilidad celular en RAW 264.7 por la técnica de reducción de sal de tetrazolio (MTT).

El crecimiento celular se determinó por reducción de MTT de acuerdo con las indicaciones insertas en el kit comercial. La enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa presente en las células vivas reduce el MTT a formazán, formando

cristales de coloración azuloides los cuales, una vez entran en contacto con DMSO pueden ser cuantificados por densidad óptica. Luego del período de incubación inicial de los macrófagos, se agregó MTT 10 μ L (5 mg/mL) y se realizó una segunda incubación por 3 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO); la absorbancia se midió a 570 nm.

6.12. Determinación de nitritos en células RAW 264.7

A través de este experimento se determinó la producción de óxido nítrico (NO) como mediador inflamatorio, el cual al someterse a la presencia de FBUOH permitió conocer la actividad atenuante del tratamiento sobre esta molécula.

Después de la incubación, los macrófagos se trataron con FBUOH a concentraciones de 1, 10 o 100 μ g/mL y lipopolisacáridos (LPS) (1 μ g/mL) durante 24 horas. Después de este período, se recogió el sobrenadante de los neutrófilos. El NO₂⁻ se determinó por la formación de los metabolitos nitrato (NO₃⁻) y nitrito (NO₂⁻), medidos en una microplaca de 96 pozos, de acuerdo con la reacción de Griess (Green et al., 1982).

El reactivo de Griess (Sulfanilamida al 1%, α -naftil etilendiamina al 0,1%) recién preparados, en presencia de metabolitos de NO produce un color rosado el cual se cuantifica por medio de las densidades ópticas (DO). La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 550 nm. Se llevó a cabo una curva patrón de NO₂⁻ (0 – 150 μ M) para calcular los niveles de nitritos.

6.13. Resultados y discusión

6.13.1. Efecto de la FBUOH sobre niveles de colesterol y triglicéridos en lípidos hepáticos de ratones con Síndrome Metabólico

Los resultados de este experimento complementaron la cuantificación realizada de lípidos sanguíneos (*ver cap. 5*) y permitieron asociar el incremento de los niveles de colesterol y triglicéridos con acumulación de lípidos hepáticos. Se observó que la FBUOH a 100 mg/kg presentó mejores resultados en cuanto a la atenuación de contenidos de colesterol y especialmente triglicéridos (Figura 6-1).

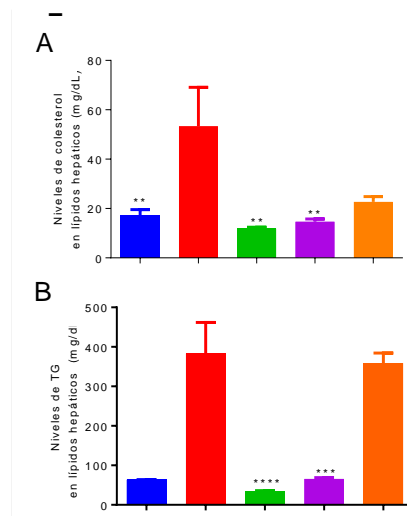


Figura 6-1. Efecto de la FBUOH sobre lípidos hepáticos de ratones con síndrome metabólico.

Normoglicémicos (azul), vehículo (rojo), metformina 250 mg/kg (verde), FBUOH 100 mg/kg (púrpura) y FBUOH 300 mg/kg (naranja) Datos expresados como media \pm DE, (n = 6). ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 y ****p<0,0001 respecto al grupo de vehículo.

Investigaciones previas han confirmado el efecto de la quercetina asociado a la cantidad contenida de grupos glicósidos. Se ha demostrado la inhibición atribuida a este flavonoide sobre el acúmulo de triglicéridos en un modelo inducido por oleato de sodio (OS). Se conoce que el microbioma intestinal interviene en la conversión del glucósido rutina (profármaco) a quercetina, contribuyendo así al efecto hipolipemiente previamente reportado (Shi et al., 2017; Tang et al., 2012). Adicionalmente, otros

estudios han evidenciado la actividad benéfica de un extracto de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*; sobre roedores con síndrome metabólico por consumo de fructosa. Los animales presentaron reversión en la acumulación grasa a nivel hepático, así como a nivel de la grasa visceral. Los hallazgos fueron atribuidos a la presencia de polifenoles como ácido cafeico y flavonoides dentro del extracto (M. J. Goss et al., 2018).

6.13.2. Efecto de la FBuOH sobre TNF- α e IL-6 en homogenado de hígado de ratones con Síndrome Metabólico

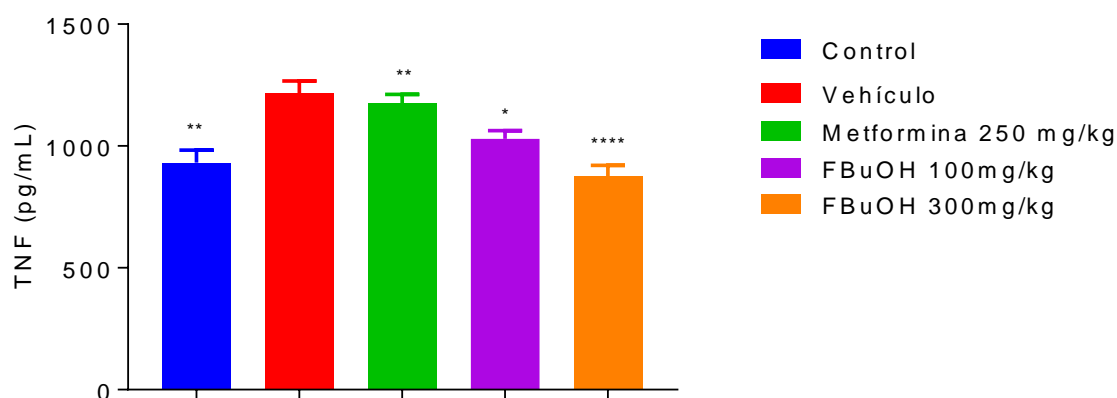


Figura 6-2. Efecto de FBuOH sobre TNF- α en homogenado de hígado de ratones con Síndrome Metabólico.

Datos expresados como media \pm DE., (n = 3). ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 y ****p<0,0001 respecto al grupo de vehículo.

Como se observa en la Figura 6-2, los niveles de TNF- α presentes en tejido hepático de animales que fueron tratados con el fármaco patrón (metformina), así como aquellos que recibieron FBuOH a ambas dosis, mostraron una disminución en la expresión de este marcador inflamatorio. Es importante tener en cuenta que estudios anteriores han demostrado la relación entre la expresión de esta interleuquina y su relación directa con la obesidad y la resistencia a insulina; incluso en ratones alimentados con fructosa se observó un aumento en la expresión de RNA mensajero de TNF- α lo cual es concordante con los datos que muestra el grupo que solamente recibió el vehículo que fue aquel que presentó los mayores niveles de este marcador inflamatorio. Adicionalmente, estos mismos ratones incrementaron sus niveles de TNF- α a nivel plasmático (Spruss et al., 2009). Otro aspecto a considerar es la influencia de estas

interleuquinas en procesos apoptóticos de islotes de células beta pancreáticas una vez se unen a las membranas celulares citoquinas como TNF- α , IL-1 β e interferón- γ (IFN- γ) induciendo la señalización para apoptosis celular (Tanaka et al., 2013). En un estudio previo, en ratas diabéticas por STZ se evidenciaron elevaciones en la expresión de p 53 como mediador apoptótico (Lu et al., 2018). Por otra parte, el tratamiento con la fracción de acetato de etilo de *P. peruviana* L. atenuó apoptosis en células renales, hepáticas y pancreáticas por lo que se considera que está implicado un mecanismo de regulación sobre la señalización de este proceso (Ezzat et al., 2021). Otro estudio demostró que la administración del flavonoide rutina a dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg disminuyó TNF- α y IL-1 β de forma dosis dependiente en ratas envejecidas (20 meses de edad), previniendo disfunciones metabólicas tendientes a presentarse durante el envejecimiento, mayor acumulación de lípidos, también afecciones sobre el retículo endoplásmico y estrés oxidativo sobre estos organelos y disfunción mitocondrial, siendo esto último el mayor factor de riesgo para conducir a resistencia a insulina (Li et al., 2016). Es importante traer a lugar la sobreexpresión de algunas adipocinas en pacientes con obesidad, por ejemplo, la leptina la cual tiene actividad proinflamatoria y su liberación que se da como mecanismo de regulación metabólica. Sin embargo, en pacientes humanos se ha demostrado que el sedentarismo y no controlar la dieta generan resistencia a esta hormona, cuya producción esta mediada por la hiperproducción de resistina aumentando así las causas del síndrome metabólico.

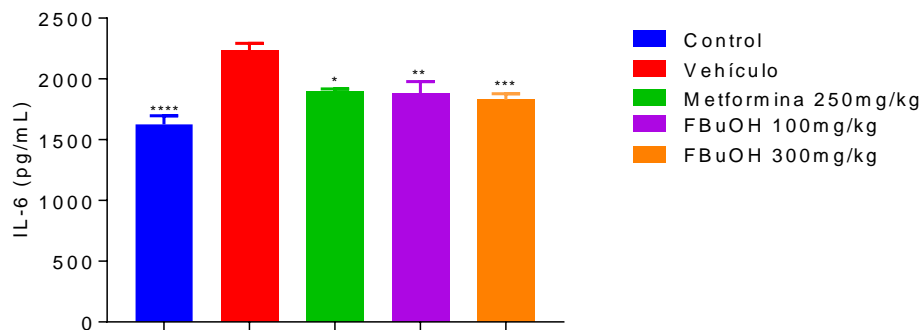


Figura 6-3. Efecto de FBuOH sobre IL-6 en homogenado de hígado de ratones con SM.

Datos expresados como media \pm DE., n = 3. ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 y ****p<0,0001 respecto al grupo de vehículo.

Como se observa en la gráfica, FBuOH disminuyó la expresión de IL-6 en ambas dosis con diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, de acuerdo con el nivel estadístico de confianza, la mayor dosis (300 mg/kg) presentó niveles menores de esta IL.

Es importante tener en cuenta la alta complejidad que surge tanto en el síndrome metabólico como en diabetes mellitus y la interrelación que se presenta en cuanto a desregulación de NGS, estrés oxidativo celular, obesidad y alteraciones hepáticas incluyendo disturbios en la respuesta antioxidante endógena, activación de citoquinas proinflamatorias y deterioro estructural y funcional de los órganos, como se observa en el siguiente esquema:

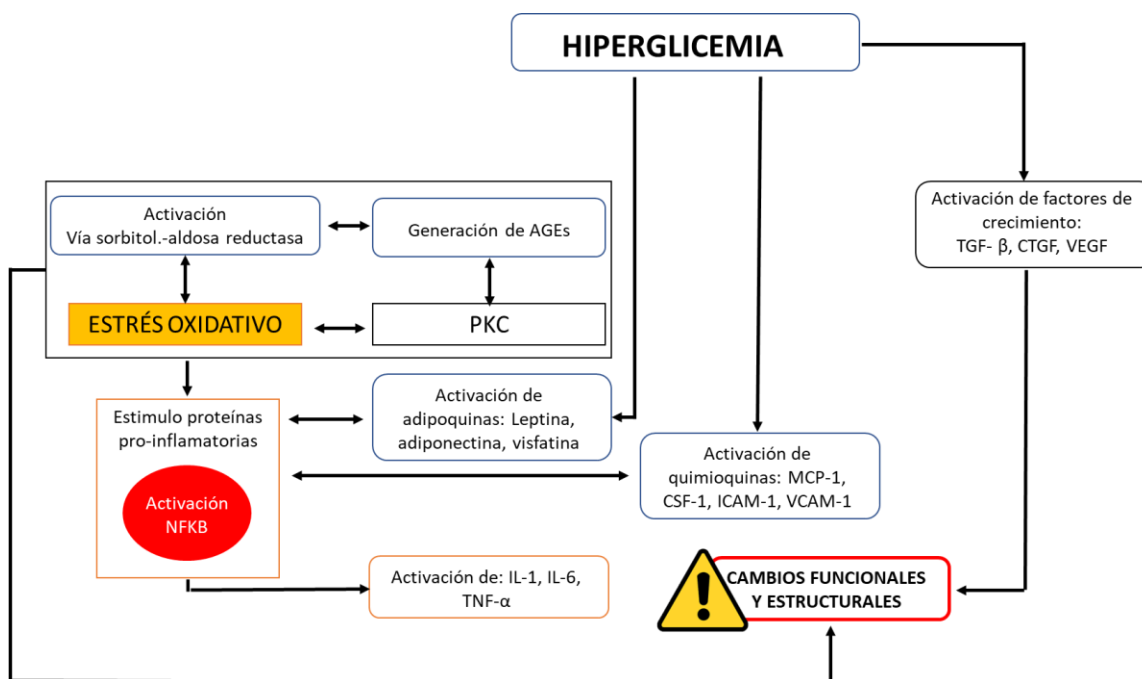


Figura 6-4. Participación de mecanismos inflamatorios en hiperglicemia crónica.

Modificado de (Luis-Rodríguez, 2012).

Entendiendo la relevancia de activación de la respuesta inflamatoria secundaria al estrés oxidativo, y de acuerdo con los resultados obtenidos en el numeral 4.6.6, se evidenció la respuesta positiva de FBuOH frente a diferentes parámetros oxidativos los cuales tienen coherencia sobre los niveles de IL-6 y TNF- α medidos *post mortem*. De

ahí la importancia de proteger los sistemas antioxidantes endógenos como catalasas, superóxido dismutasa entre otros para prevenir el avance y la complicación del daño celular, funcional y tisular de diferentes órganos y sistemas.

6.13.3. Efecto de la FBUOH sobre TNF- α , IL-6 y NO $_2$ · en macrófagos RAW 264.7

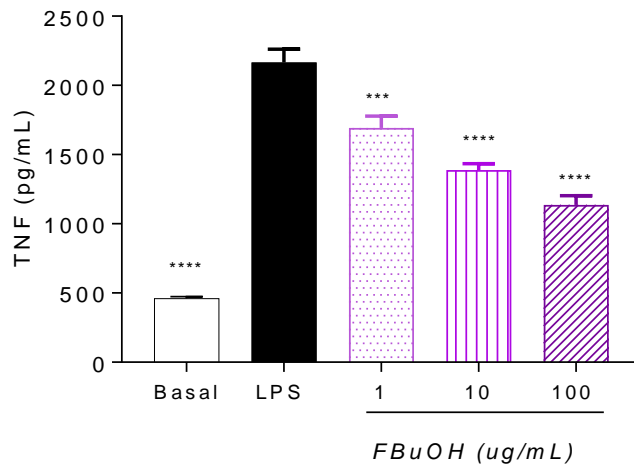


Figura 6-5. Efecto de FBUOH a diferentes concentraciones sobre la producción de TNF- α en células RAW 264.7.

Datos expresados como media \pm DE., n=3. ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 y ****p<0,0001 respecto al grupo LPS.

En la Figura 6-5 se evidencia la respuesta favorable que tienen los grupos tratados, disminuyendo la expresión de TNF- α de manera concentración-dependiente, presentando todos los grupos diferencias estadísticamente significativas, especialmente a concentraciones de 1, 10 y 100 μ g/mL, cuando se compara con el grupo LPS. Trabajos previos han demostrado hallazgos similares, reportando disminución de TNF- α en células RAW estimuladas por LPS tratadas con un extracto de *Citri Reticulatae Pericarpium* el cual contiene al flavonoide rutina (Zhang et al., 2022). Por otra parte, la quercetina también ha mostrado un efecto inhibitorio sobre esta citoquina proinflamatoria (Nayak et al., 2016; Wang & Mazza, 2002).

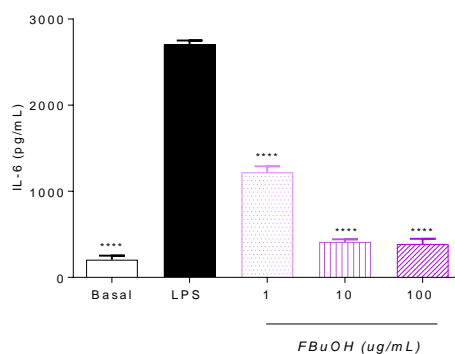


Figura 6-6. Efecto de FBUOH a diferentes concentraciones sobre la producción de IL-6 en células RAW 264.7.

Datos expresados como media \pm DE., $n=3$. ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$ respecto al grupo de LPS.

Como se observa en la Figura 6-6, también se evidenció la reducción en la expresión de IL-6 de manera concentración-dependiente, presentando todos los grupos diferencias estadísticamente significativas, especialmente a concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, cuando se compara con el grupo DMSO. Estos datos confirman los resultados obtenidos en homogenado de hígado frente a la actividad moduladora sobre IL-6.

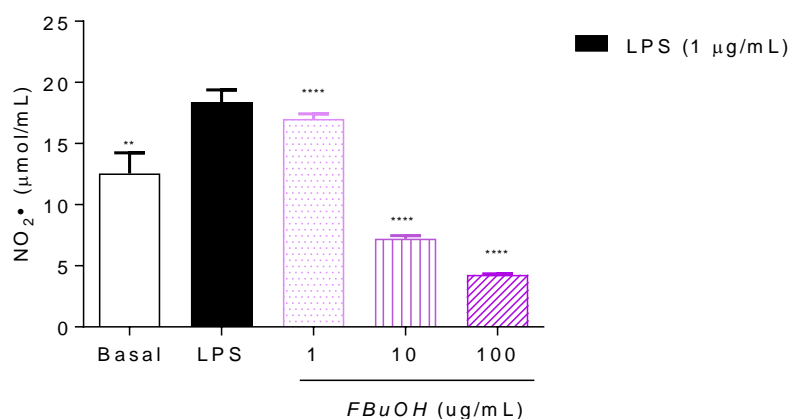


Figura 6-7. Efecto de FBUOH a diferentes concentraciones sobre la producción de NO₂· en células RAW 264.7.

Datos expresados como media \pm DE., $n = 3$. ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ y **** $p<0,0001$ respecto al grupo de vehículo.

La medición de nitritos es un importante parámetro de estatus inflamatorio, en condiciones fisiológicas su producción busca proteger y defender al organismo de patógenos antes de la migración leucocitaria, por esta razón este experimento es ampliamente utilizado para testear diferentes drogas (Joo et al., 2014). Al comparar los resultados de la fracción a diferentes concentraciones las células tratadas presentan un menor contenido de nitritos frente al grupo LPS. Investigaciones previas han demostrado la relación entre la captación de radicales libres y la modulación inflamatoria los cuales se ven neutralizados en presencia de polifenoles, entre estos, la quercetina (Joo et al., 2014).

6.13.4. Efecto de la FBUOH sobre la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7

La información obtenida en este experimento permite descartar que los efectos inhibitorios de la fracción, observados en los anteriores gráficos estén dados por citotoxicidad de la misma (Wang & Mazza, 2002).

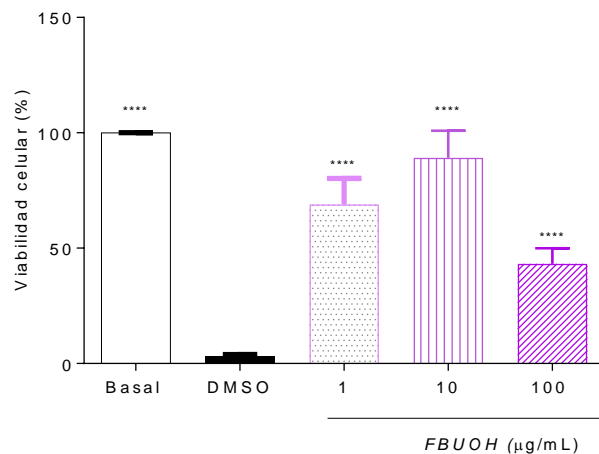


Figura 6-8. Efecto de FBUOH a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular por el método MTT en células RAW 264.7.

Datos expresados como media \pm D.E., n=3. ANOVA de una vía; prueba post-hoc Dunnett *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 y ****p<0,0001 respecto al grupo de DMSO.

Estudios previos demostraron el efecto modulador de una fracción glucosídica de los cálices de *P. peruviana* sobre marcadores de inflamación. En este extracto se encontraron presentes: Peruviosas A y B y a estas se les atribuyó la actividad antiinflamatoria probada en un modelo de edema plantar por carragenina. En una segunda fase, este efecto fue testado en células RAW 264.7 en las que se midió la producción de TNF- α , NO \cdot y PGE2, finalmente se determinó la viabilidad celular por MTT. Los resultados demostraron que la combinación de estas Peruviosas redujo la viabilidad celular sin presentar toxicidad a 10 μ g/mL, también se redujo la producción de NO \cdot dependiendo de la concentración testada (Franco et al., 2014). Los resultados obtenidos permiten inferir que posiblemente las Peruviosas presentes en este extracto jugaron un rol importante sobre la modulación en la expresión de marcadores inflamatorios sin embargo, no sobre la viabilidad celular. La FBUOH contiene una combinación de compuestos que permite realizar la modulación sin poner en riesgo la viabilidad celular, haciendo la FBUOH más viable para su utilización a futuro en humanos.

6.14. Conclusiones

Entendiendo la relevancia de activación de la respuesta inflamatoria secundaria al estrés oxidativo y de acuerdo con los resultados obtenidos, se evidenció la respuesta positiva de FBUOH frente a diferentes parámetros oxidativos los cuales tienen coherencia sobre los niveles de IL-6 y TNF- α medidos *post mortem*, esto demuestra que FBUOH protegió los sistemas antioxidantes endógenos como catalasa, superóxido dismutasa entre otras. Así mismo, se obtuvo información relevante que mostró que la FBUOH favorece la viabilidad celular demostrada a través de los experimentos complementarios en células RAW 264.7.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

Se comprobaron los efectos preliminares antioxidantes *in vivo* y antihiperlicemiantes en modelos *in vivo* utilizando como tratamientos el extracto hidroalcohólico de *P. peruviana* y las fracciones obtenidas a partir de este. A partir de estos resultados se profundizó en el estudio de FBuOH en tres biomodelos; uno de hiperglicemia transitoria y dos con trastornos asociados a hiperglicemia sostenida o crónica. En todos se demostró la actividad protectora de FBuOH frente a estrés oxidativo y presentando el mejor comportamiento a dosis de 100 mg/kg. Los animales tratados a esta dosis en los modelos crónicos atenuaron los NGS, perfiles lipídicos y marcadores de estrés oxidativo, así como marcadores de inflamación TNF- α e IL-6 observables en los animales con síndrome metabólico. El análisis cromatográfico de FBuOH, así como el perfil metabólico de la misma evidenció la presencia de flavonoides, entre estos Quercetina 3-*O*-rutinosido (rutina) y de varios compuestos de relevancia terapéutica como los son los witanólidos y ácidos fenólicos como: ácido cafeico y derivados del ácido ferúlico. Dentro de los modos de acción antidiabética de FBuOH se encontró la modulación de citoquinas proinflamatorias, la inhibición de carbohidrasas intestinales, la preservación de islotes pancreáticos y de la producción de insulina y otros tejidos por la actividad neutralizadora de la FBuOH sobre radicales libres; los resultados también sugieren la actividad atenuante de FBuOH sobre los niveles de colesterol y por ende de la resistencia a insulina. La FBuOH demostró su utilidad frente a diabetes mellitus y síndrome metabólico como coadyuvante en el tratamiento de sus signos y como preventivo frente a las complicaciones propias de ambos síndromes.

7.2. Recomendaciones

Dado que entre los resultados obtenidos en ambos modelos *in vivo* se evidenció un comportamiento diferente en cuanto a la dosis dependencia de FBuOH, conociendo los posibles compuestos presentes en la fracción se recomienda realizar experimentos puntuales con los compuestos puros en diferentes proporciones tipo isobogramas con el fin de conocer los posibles comportamientos sinérgicos o antagónicos de las diferentes combinaciones entre compuestos.

Así mismo, incursionar en los estudios en genómica con el extracto y la fracción butanólica nos permitiría conocer modos de acción específico relacionado con la expresión de genes o silenciamiento de estos involucrados con complicaciones del síndrome diabético (obesidad, señalización de la insulina).

Reconocimientos

Colciencias convocatoria No. 647 Nacional 2016-1, Universidad Nacional de Colombia. Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 249 de 2019 que el Grupo “Principios Bioactivos en Plantas Medicinales” (COL0014832) suscrito con el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Universidade do Valei do Itajaí, Facultad de Farmacia (Santa Catarina-Brasil).

Productos de investigación obtenidos

Poster: Antidiabetic activity of butanol fraction of calyces from *Physalis peruviana* in streptozotocin-induced diabetic mice. Congreso: IV ABCF CONGRESS. São Paulo-Brasil. Fecha: 6 al 8 de septiembre de 2018.

Artículo publicado (participación): 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), 010-018.

Artículo publicado (participación): Cardona, M. I., Dominguez, G. P., Echeverry, S. M., Valderrama, I. H., Bernkop-Schnürch, A., & Aragón, M. (2021). Enhanced oral bioavailability of rutin by a self-emulsifying drug delivery system of an extract of calyces from *Physalis peruviana*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102797.

Artículo publicado (primer autor): Valderrama, I. H., Echeverry, S. M., Rey, D. P., Rodríguez, I. A., Silva, F. R. M. B., Costa, G. M., ... & Aragón, D. M. (2022). Extract of Calyces from *Physalis peruviana* Reduces Insulin Resistance and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Pharmaceutics*, 14(12), 2758.

Capítulo de libro (primer autor): Handbook of Goldenberry (*Physalis peruviana*) Cultivation, Processing, Chemistry, and Functionality. Protective *in vivo* activity of an extract of calyces from *Physalis peruviana* on oxidation and glycation". 1st Edition- January 20, 2024. Paperback ISBN: 9780443154331.

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-kb pathway/mir-146a expression modulation. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox10111713>
- Abu-Amsha, R., Croft, K.D., Puddey, I.B., Proudfoot, J.M., Beilin, L.J., 1996. Phenolic content of various beverage AGEs determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation *in vitro*: Identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clinical Science*. 91, 449–458. <https://doi.org/10.1042/cs0910449>
- Adjimani, J.P., Asare, P., 2015. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*. 2, 721–728. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.04.005>
- Al-Romaiyan, A., Liu, B., Asare-Anane, H., Maity, C.R., Chatterjee, S.K., Koley, N., Biswas, T., Chatterji, A.K., Huang, G.C., Amiel, S.A., Persaud, S.J., Jones, P.M., 2010. A novel *Gymnema sylvestre* extract stimulates insulin secretion from human islets *in vivo* and *in vitro*. *Phytotherapy Research*. 24, 1370–1376. <https://doi.org/10.1002/ptr.3125>
- Alam, S., Sarker, M., Sultana, T., Chowdhury, M., Rashid, M., Chaity, N., Zhao, C., Xiao, J., Hafez, E., Khan, S., Mohamed, I., 2022. Antidiabetic Phytochemicals From Medicinal Plants: Prospective Candidates for New Drug Discovery and Development. *Frontiers in Endocrinology*. 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.800714>
- Albu, E., Lupaşcu, D., Filip, C., Jaba, I.M., Zamosteanu, N., 2013. The influence of a new rutin derivative on homocysteine, cholesterol and total antioxidative status in experimental diabetes in rat. *Farmacía*. 61, 1167–1177.
- American Diabetes Association, 2019. ¿Tiene riesgo de padecer de diabetes tipo 2? ¿Qué sigue? 2019.
- Ang, S., Eckling, K., Arcone, M., Akuda, Y., Sao, R. 2011. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 59, 960–968. <https://doi.org/10.1021/jf1040977>
- Antia, B.S., Okokon, J.E., Okon, P.A., 2005. Hypoglycemic activity of aqueous leaf extract of *Persea americana* Mill. *Indian Journal of Pharmacology*. 37, 325–326. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.16858>
- Aragón, D.M., Echeverry, S.M., Valderrama, I.H., Costa, G.M., Ospina, L.F., 2018. Development and optimization of microparticles containing a hypoglycemic fraction of calyces from *Physalis peruviana*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8, 10–18.

<https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8502>

- 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): estudios químicos y farmacológicos de una es planta con potencial terapéutico. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. <https://doi.org/https://doi.org/10.36385/FCBOG-12-0>
- Arias Díaz, J., Balibrea, J., 2007. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Revista Nutrición Hospitalaria*. 22, 160–168.
- Aristizábal, A.M. (Corporación U.L., 2013. Uchuva (*Physalis peruviana* L): estudio de su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos con características funcionales. Tesis Maest. 1–43.
- Arumugam, G., Manjula, P., Paari, N., 2013. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease*. 2, 196–200. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60126-2](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60126-2)
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J., Hackett, L., Topping, J., Winchester, B., 1997. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology* 7. 1085–1088. <https://doi.org/10.1093/glycob/7.8.1085>
- Assadi, S., Shafiee, S.M., Erfani, M., Akmal, M., 2021. Antioxidative and antidiabetic effects of *Capparis spinosa* fruit extract on high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 138, 111391. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111391>
- Bernal, C.A., Castellanos, L., Aragón, D.M., Martínez-Matamoros, D., Jiménez, C., Baena, Y., Ramos, F.A., 2018. Peruvioses A to F, sucrose esters from the exudate of *Physalis peruviana* fruit as α -amylase inhibitors. *Carbohydrate research*. 461, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.03.003>
- Bernal, M., Correa, Q., 1998. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Editora Guadalupe Ltda, Bogotá, Colombia.
- Black, P.H., 2003. The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain Behavior, and Immunity*. 17, 350–364. [https://doi.org/10.1016/S0889-1591\(03\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0889-1591(03)00048-5)
- Boden, G., Homko, C., Barrero, C.A., Stein, T.P., 2017. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Science Translational medicine*. 7, 304. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4765>.
- Boudreau, A., Poulev, A., Ribnicky, D.M., Raskin, I., Rathinasabapathy, T., Richard, A.J., Stephens, J.M., 2019. Distinct fractions of an *Artemisia scoparia* extract contain compounds with novel adipogenic bioactivity. *Frontiers in Nutrition*. 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00018>
- Bradmus, J.A., Adedosu, T.O., Fatoki, J.O., Adegbite V.A., Adaramoye O.A., Odunola, O., 2011. Lipid Peroxidation Inhibition and Antiradical Activities of Some Leaf Fractions of *Mangifera Indica*. *Acta Pol Pharm*. 68, 23–29.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28, 25–30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cameron, A.R., Morrison, V.L., Levin, D., Mohan, M., Forteath, C., Beall, C., McNeilly, A.D., Balfour, D.J.K., Savinko, T., Wong, A.K.F., Viollet, B., Sakamoto, K., Fagerholm, S.C., Foretz, M., Lang, C.C., Rena, G., 2016. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circulation Research*. 119, 652–665.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308445>
- Cardona, M.I., 2014. Aporte a la estandarización de un extracto de cálices de *Physalis peruviana*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Cardona, M.I., Toro, R.M., Costa, G.M., Ospina, L.F., Castellanos, L., Ramos, F.A., Aragón, D.M., 2017. Influence of extraction process on antioxidant activity and rutin content in *Physalis peruviana* calyces extract. *Journal Applied Pharmaceutical Science*. 7, 164–168.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70623>
- Carvalho, E.N. de, Carvalho, N.A. de, Ferreira, L.M., 2003. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 18, 60–64.
<https://doi.org/10.1590/s0102-86502003001100009>
- Cazarolli, L., Zanatta, L., Alberton, E., Bonorino Figueiredo, M.S., Folador, P., Damazio, R., Pizzolatti, M., Barreto Silva, F.R., 2008. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 8, 1429–1440.
<https://doi.org/10.2174/138955708786369564>
- Chasquibol, N., Yacono, J., 2015. Composición fitoquímica del aceite de las semillas del fruto del “Aguaymanto”, *Physalis peruviana* L. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 81, 311–318.
- Cooper, M.A., Ryals, J.M., Wu, P.Y., Wright, K.D., Walter, K.R., Wright, D.E., 2017. Modulation of diet-induced mechanical allodynia by metabolic parameters and inflammation. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 22, 39–46.
<https://doi.org/10.1111/jns.12199>
- Costa, G.M., 2013. Estudio Químico de Espécies Brasileiras e Colombianas de Passiflora. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Santa Catarina.
- Cryer, P.E., 2016. Hypoglycemia in Type 2 Diabetes. *Type 2 Diabetes mellitus: An evidence-based Approach to Practical Management*. Second Ed. 28, 227–236.
<https://doi.org/10.3109/9780849379581-19>
- Darwish, A.G., Mahmoud, H.I., Refaat, I., 2020. Antioxidative and Antidiabetic Effect of Goldenberries juice and pomace on Experimental Rats Induced with streptozotocin *In vitro*. *Journal of Food Dairy Science*. 11, 277–283.
<https://doi.org/10.21608/jfds.2020.118371>
- De La O-Quezada, G.A., Damaris, ;, Ojeda-Barríos, L., Ofelia, ¶ ;, Hernández-Rodríguez, A., Sánchez-Chávez, E., Jaime Martínez-Tellez, ;, 2011. Biomasa, Prolina Y Parámetros Nitrogenados En Plántulas De Nogal Bajo Estrés Hídrico Y Fertilización Nitrogenada. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 17, 13–18.

- De Paiva, L.B., Goldbeck, R., dos Santos, W.D., Squina, F.M., 2013. Ferulic acid and derivatives: Molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. 49, 395–411. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300002>
- Derbré, S., Gatto, J., Pelleray, A., 2010. Automating a 96-well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers : Application to the screening of a small natural. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 398, 1747–1758. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4065-1>
- Devkar, S.T., Muthal, A.P., Patil, P. V., Mukherjee-Kandhare, A.A., Kandhare, A.D., Jagtap, S.D., Bodhankar, S.L., Hegde, M. V., 2021. Evaluation of the physicochemical stability and biological activity of withanolide rich fraction from *Withania somnifera* root by hplc and cyclic voltammetry: A simple, reliable, and cost-effective approach. *Latin American Journal of Pharmacy*. 40, 946–956.
- Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2014. *Diabetes Care*. 37.
- Dinan, L.N., Sarker, S.D., Šik, V., 1997. 28-Hydroxywithanolide E. from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry* 44, 509–512. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00553-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00553-5)
- Domínguez Moré, G.P., Cardona, M.I., Sepúlveda, P.M., Echeverry, S.M., Oliveira Simões, C.M., Aragón, D.M., 2021. Matrix effects of the hydroethanolic extract of calyces of *Physalis peruviana* l. On rutin pharmacokinetics in wistar rats using population modeling. *Pharmaceutics*. 13,(4), 535. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040535>
- Dos Santos, M., Prestes, A.S., de Macedo, G.T., Ecker, A., Barcelos, R.P., Boligon, A.A & Barbosa, N.V. 2018. *Syzygium cumini* leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the lipoprotein from glycation. *Journal of Ethnopharmacology*. 210, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.033>
- Dos Santos, J.M., Alves Junior, V.V., Boleti, A.P. de A., Lima, E.S., Carollo, C.A., dos Santos, E.L., Rabelo, L.A., Alfredo, T.M., Melo da Cunha, J. da S., de Picoli Souza, K., 2018. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidiabetic activity of *Apis mellifera* bee tea. *PLoS One*. 13 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197071>
- Endale, M & Endalo M. 2015. Recent trends in rapid dereplication of natural product extracts: an update. *Journal of Coastal Life Medicine*. 3 (3), 178-182 <https://doi.org/10.12980/jclm.3.201514j66>
- Ezzat, S.M., Abdallah, H.M.I., Yassen, N.N., Radwan, R.A., Mostafa, E.S., Salama, M.M., Salem, M.A., 2021. Phenolics from *Physalis peruviana* fruits ameliorate streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in rats via induction of autophagy and apoptosis regression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111948>
- Fischer, G., Almanza-Merchán, P.J., Miranda, D., 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 36, 01–15. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>
- Flórez, V., Fischer, G., 2000. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* l.). *Editorial Universidad Nacional de Colombia*. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>
- Folch, J., Lees, M., Sloane, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of

- total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- Fontana, D., Cazarolli, L.H., Lavado, C., Mengatto, V., Figueiredo,., Guedes, A., Pizzolatti, M., Silva, F., 2011. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* . 27, 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.008>
- Franco, L.A., Ocampo, Y.C., Gómez, H.A., De La Puerta, R., Espartero, J.L., Ospina, L.F., 2014. Sucrose esters from *Physalis peruviana* calyces with anti-inflammatory activity. *Planta Médica*. 80, 1605–1614. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383192>
- Franco LA, Matiz GE, Calle J, Pinzón R, O.L., 2007. Actividad antinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica*. 27, 110–5.
- Fuangchan, A., Sonthisombat, P., Seubnukarn, T., Chanouan, R., Chotchaisuwat, P., Sirigulsatien, V., Ingkaninan, K., Plianbangchang, P., Haines, S.T., 2011. Hypoglycemic effect of bitter melon compared with metformin in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *Journal of Ethnopharmacology*. 134, 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.045>
- Furman, B.L., 2015. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 70, 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- Gastell, P., De Alejo, J. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 29, 192–198.
- Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 107, 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/circresaha.110.223545>
- Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., Villaño, D., Speisky, H., García-Viguera, C., Moreno, D.A., 2014. Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of Functional Foods*. 7, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.025>
- Goss, M J, Nunes, M.L., Machado, I.D., Merlin, L., Macedo, N.B., Silva, A.M., Bresolin, TM., 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>
- Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-abdallah, F., Chasteen, N.D., 2007. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry ' s bio-effects. *Dalton Transactions*. 43, 4951–4961. <https://doi.org/10.1039/b705136k>
- 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, 101545–101559. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21074>
- Hussain, S.A.R., 2007. Silymarin as an adjunct to glibenclamide therapy improves long-term and postprandial glycemic control and body mass index in type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Food*. 10, 543–547. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.089>

- Ibrahim, M.A., Habila, J.D., Koorbanally, N.A., Islam, M.S., 2016. Butanol fraction of *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don leaves enhance β -cell functions, stimulates insulin secretion and ameliorates other type 2 diabetes-associated complications in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 183, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.018>
- Imran, A., Butt, M.S., Arshad, M.S., Arshad, M.U., Saeed, F., Sohaib, M., Munir, R., 2018. Exploring the potential of black tea based flavonoids against hyperlipidemia related disorders. *Lipids in Health and Disease*. 17, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0688-6>
- Ishibashi, Y., Matsui, T., Nakamura, N., Sotokawauchi, A., Higashimoto, Y., Yamagishi, S.I., 2017. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone-1 evokes inflammatory reactions in endothelial cells via an interaction with receptor for advanced glycation end products. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 14, 450-453. <https://doi.org/10.1177/1479164117715855>
- Janssen, B., De Celle, T., Debets, J., Brouns, A., Callahan, M., Smith, T., 2004. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 287, 1618-1625. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01192.2003>
- Je, H.D., Shin, C.Y., Park, S.Y., Yim, S.H., Kum, C., Huh, I.H., Kim, J.H., Sohn, U.D., 2002. Combination of vitamin C and rutin on neuropathy and lung damage of diabetes mellitus rats. *Archives of Pharmacal Research*. 25, 184-190. <https://doi.org/10.1007/BF02976561>
- Ji, S., Zhu, C., Gao, S., Shao, X., Chen, X., Zhang, H., Tang, D., 2021. *Morus alba* leaves ethanol extract protects pancreatic islet cells against dysfunction and death by inducing autophagy in type 2 diabetes. *Phytomedicine*. 83, 153478. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153478>
- Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J.A., Briggs, C.J., 2007. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*. 40, 356-364. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.009>
- Joo, T., Sowndhararajan, K., Hong, S., Lee, J., Park, S.Y., Kim, S., Jhoo, J.W., 2014. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi Journal of Biological Science*. 21, 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.04.003>
- Jurado, B., Aparcana, I.M., Villarreal, L.S., Ramos, E., Hurtado, P.E., Acosta, K.M. Calixto, M.R. 2016. Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 82, 272-279. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v82i3.58>
- Kamalakkannan, N., Prince, P.S.M., 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 98, 97-103. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_241
- Kappel, V.D., Cazarolli, L.H., Pereira, D.F., Postal, B.G., Madoglio, F.A., Buss, Z. da S., Reginatto, F.H., Silva, F.R.M.B., 2013. Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: Multiple sites of action. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 23, 706-715. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000062>

- Kappel, V.D., Frederico, M.J.S., Postal, B.G., Mendes, C.P., Cazarolli, L.H., Silva, F.R.M.B., 2013. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: Potential insulin secretagogue effect. *European Journal of Pharmacology*. 702, 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.055>
- Kasali, F.M., Kadima, J.N., Mpiana, P.T., Ngbolua-Koto-te-Nyiwa, Tshibangu, D.S.-T., 2013. Assessment of antidiabetic activity and acute toxicity of leaf extracts from *Physalis peruviana* L. in guinea-pig. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3, 841–846. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60166-5](https://doi.org/doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60166-5)
- Kasali, F.M., Tusiimire, J., Kadima, J.N., Tolo, C.U., Weisheit, A., Agaba, A.G., 2021. Ethnotherapeutic Uses and Phytochemical Composition of *Physalis peruviana* L.: An Overview. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2021/5212348>
- Kasali, F.M., Tuyiringire, N., Peter, E.L., Ahoogbe, L.Y., Ali, M.S., Tusiimire, J., Ogwang, P.E., Kadima, N.J., Agaba, A.G., 2022. Chemical constituents and evidence-based pharmacological properties of *Physalis peruviana* L. : An overview. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 1, 35–47. <https://doi.org/10.34172/jhp.2022.04>
- Kennedy, M.L., María, E., Diarte, G., Monserrat, C., Escurra, C., Campuzano, M.Á., Farmacología, D. De, Ciencias, F. De, Campus, Q., 2010. Evaluación preliminar de la toxicidad, el efecto sobre el comportamiento y la actividad analgésica de *Aloysia virgata* var. *platiphylla* en ratones.
- Kurien, B.T., Hensley, K., Bachmann, M., Scofield, R.H., 2006. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 41, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.020>
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*. 46 (5), 224–282. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.05.002>
- Lan, Y.H., Chang, F.R., Pan, M.J., Wu, C.C., Wu, S.J., Chen, S.L., Wang, S.S., Wu, M.J., Wu, Y.C., 2009. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. *Food Chemistry*. 116, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.061>
- Lee, K.H., Cha, M., Lee, B.H., 2020. Neuroprotective effect of antioxidants in the brain. *International Journal of Molecular Science*. 21 (19), 7152. <https://doi.org/10.3390/ijms21197152>
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51, 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
- Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M., 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology and Medicine*. 20 (3), 463–466. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)02051-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)02051-5)
- Levin-Arama, M., Abraham, L., Waner, T., Harmelin, A., Steinberg, D.M., Lahav, T., Harlev, M., 2016. Subcutaneous compared with intraperitoneal ketamine-xylazine for anesthesia of mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 55, 794–800.
- Levitan, I., Volkov, S., Subbaiah, P. V., 2010. Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 13 (1), 39–75.

<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2733>

- Li, J.M., Wang, C., Hu, Q.H., Kong, L.D., 2008. Fructose induced leptin dysfunction and improvement by quercetin and rutin in rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 6 (6), 466–473. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2008.00466>
- Li, T., Chen, S., Feng, T., Dong, J., Li, Y., Li, H., 2016. Rutin protects against aging-related metabolic dysfunction. *Food & Nutrition*. 7, (2). 1147–1154. <https://doi.org/10.1039/c5fo01036e>
- Lim, J.S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J.M., Lustig, R.H., 2010. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 7, 251–264. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.41>
- Lisset, M., Regal, L., Hermes, L., Otero, G., Alina, Z., Otero, G., Omar, J., 2013. Etiopatogenia de la microangiopatía diabética . Consideraciones bioquímicas y moleculares. *Revista Finlay*. 3, 2–12.
- Liu, Z., Hu, M., 2007. Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 3 (3), 389–406. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.3.389>
- Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R, 2016. Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *Natural Product Communications*. 11, 1–29.
- Lockwood, G.B., 2005. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.008>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu, Q., Zhou, Y., Hao, M., Li, C., Wang, J., Shu, F., Du, L., Zhu, X., Zhang, Q., Yin, X., 2018. The mTOR promotes oxidative stress-induced apoptosis of mesangial cells in diabetic nephropathy. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 473, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.12.012>
- Lue, B.M., Nielsen, N.S., Jacobsen, C., Hellgren, L., Guo, Z., Xu, X., 2010. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. *Food Chemistry*. 123 (2), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.009>
- Lv, Y., Zhao, P., Pang, K., Ma, Y., Huang, H., Zhou, T., Yang, X., 2021. Antidiabetic effect of a flavonoid-rich extract from *Sophora alopecuroides* L. in HFD- and STZ- induced diabetic mice through PKC/GLUT4 pathway and regulating PPAR α and PPAR γ expression. *Journal of Ethnopharmacology*. 268, 113654. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113654>
- Mahecha, J.N., 2017. Aporte a la caracterización fitoquímica de un extracto hidroalcohólico de cálices de *Physalis peruviana* recolectados en el municipio de Granada-Cundinamarca Contribution to the phytochemical characterization of an hydroalcoholic extract. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.
- Mahrous, R.S., Fathy, H.M., El-Khair, R.M.A., Omar, A.A., 2019. Chemical constituents of egyptian *Withania somnifera* leaves and fruits and their anticholinesterase activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 63, 208–217.

- <https://doi.org/10.29356/jmcs.v63i4.944>
- Mansour, H.B., Yatouji, S., Mbarek, S., Houas, I., Delai, A., Dridi, D., 2011. Correlation between antitubutyrylcholinesterasic and antioxidant activities of three aqueous extracts from Tunisian *Rhus pentaphyllum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 10 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-32>
- Mansuroğlu, B., Derman, S., Yaba, A., Kizilbey, K., 2015. Protective effect of chemically modified SOD on lipid peroxidation and antioxidant status in diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.039>
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- Mattson, M.P., 2008. Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*. 7 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- McColl, A.J., Kong, C., Nimmo, L., Collins, J., Elkeles, R.S., Richmond, W., 1997. 132 Total antioxidant status, protein glycation, lipid hydroperoxides in non insulin dependent diabetes mellitus. *Biochemical Society Transactions*. 25. <https://doi.org/10.1042/bst025s660>
- Medina, S., Collado-González, J., Ferreres, F., Londoño-Londoño, J., Jiménez-Cartagena, C., Guy, A., Durand, T., Galano, J.M., Gil-Izquierdo, Á., 2019. Potential of *Physalis peruviana* calyces as a low-cost valuable resource of phytoprostanes and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99 (5), 2194–2204. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9413>
- Ministerio de Salud y Protección social, 2022. En el Día Mundial de la Diabetes: MinSalud promueve prácticas de vida saludable. Boletín prensa No. 543 2022. <https://www.minsalud.gov.co>
- Miranda, C.A., Schönholzer, T.E., Klöppel, E., Sinzato, Y.K., Volpato, G.T., Damasceno, D.C., Campos, K.E., 2019. Repercussions of low fructose-drinking water in male rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 91, 1–10. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920170705>
- Monzón, G., Meneses, C., Forero, A.M., Rodríguez, J., Aragón, M., Jiménez, C., Ramos, F.A., Castellanos, L., 2021. Identification of α -Amylase and α -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*. 69 (9), 2919–2931. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07850>
- Mora, Á.C., Aragón, D.M., Ospina, L.F., 2010. Effects of *Physalis peruviana* fruit extract on stress oxidative parameters in streptozotocin-diabetic rats. *Latin American Journal of Pharmacy*. 29, 1132–1136.
- Muñoz, Ó.A., Torres, G.A., Núñez, J.A., De la Rosa, L.A., Rodrigo, J., Aya, J.F., Álvarez, E., 2017. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con

- Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Tip.* 20 (2), 23–28.
<https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Murillo, E., Tique, M., Ospina, F., Lombo, O., 2006. Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas.* 35, 64–80.
- Nayak, B.N., Kaur, G., Buttar, H.S., 2016. TNF- α modulation by natural bioactive molecules in mouse RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Complementary and Integrative Medicine.* 13 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0024>
- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., Grune, T., 2015. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules.* 194–222.
<https://doi.org/10.3390/biom5010194>
- Oboh, G., Ademosun, A.O., Ayeni, P.O., Omojokun, O.S., Bello, F., 2015. Comparative effect of quercetin and rutin on α -amylase, α -glucosidase, and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Comparative Clinical Pathology.* 24, 1103–1110.
<https://doi.org/10.1007/s00580-014-2040-5>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry.* 95 (2), 351–358.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., Ajith, T.A., 2010. Ameliorating reactive oxygen species-induced *in vitro* lipid peroxidation in brain, liver, mitochondria and DNA damage by *Zingiber officinale* Roscoe. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 25, 351–358.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Olabiya, A.A., Alli Smith, Y.R., Babatola, L.J., Akinyemi, A.J., Oboh, G., 2016. Inhibitory effect of aqueous extract of different parts of *Gossypium herbaceum* on key enzymes linked with type 2 diabetes and oxidative stress in rat pancreas *in vitro*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science.* 5 (2), 180–186.
<https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.05.003>
- OPS, 2022. Diabetes. Citado el 14 febrero de 2022. Disponible en:
<https://www.paho.org/es/temas/diabetes>
- Pai Kotebagilu, N., Reddy Palvai, V., Urooj, A., 2014. Protective Effect of Selected Medicinal Plants against Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Damage on Biological Substrates. *International Journal of Medicinal Chemistry.* 2014, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2014/861084>
- Panunti, B., Jawa, A.A., Fonseca, V.A., 2004. Mechanisms and therapeutic targets in type 2 diabetes mellitus. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 1 (2), 151–157.
<https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2004.09.011>
- Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, J.L., Barnett, J., Fong, L.G., Stocker, R., Rapp, J.H., Kim, K.Y., Feingold, K.R., Kohlschütter, A., Beisiegel, U., Stanley, K.K., Stocker, R., Nordestgaard, B.G., Nielsen, L.B., Wootton, R., Lewis, B., Gaziano, J.M., Hübner, C., Finckh, B., Kohlschütter, A., Beisiegel, U., 1999. Measurement of oxidizability of blood plasma. *Methods in Enzymology.* 299, 35–49.

- Patel, S., Santani, D., 2009. Role of NF- κ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacological Reports*. 61 (4), 595–603. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70111-2](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70111-2)
- Perera, H., 2016. Antidiabetic Effects of *Pterocarpus marsupium* (Gammalu). *European Journal of Medicinal Plants*. 13 (4), 1–14. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2016/23930>
- Poovitha, S., Siva Sai, M., Parani, M., 2017. Protein extract from the fruit pulp of *Momordica dioica* shows anti-diabetic, anti-lipidemic and antioxidant activity in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*. 33, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.042>
- Puente, L., Pinto, M.C., Castro, E., Cortés, M., 2011. *Physalis peruviana* L, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*. 44 (7), 1733–1740.
- Qu, H.Q., Li, Q., Rentfro, A.R., Fisher-Hoch, S.P., McCormick, J.B., 2011. The definition of insulin resistance using HOMA-IR for americans of mexican descent using machine learning. *PLoS One* 6. 6 (6), e21041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021041>
- Ramadan, M.F., 2012. *Physalis peruviana* pomace suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Grasas y aceites*. 63 (4), 411–422.
- Ramadan, M.F., 2011. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*. 44 (7), 1830–1836. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.042>
- Ramadan, M.F., Moersel, J.T., 2007. Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice. *Journal of Science, Food & Agriculture*. 87 (3), 452–460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2728>
- Ramadan, M.F., Morsel, J.T., 2003. Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51 (4), 969–974. <https://doi.org/10.1021/jf020778z>
- Ramchoun, M., Sellam, K., Harnafi, H., Alem, C., Benlyas, M., El Rhaffari, L., Amrani, S., 2015. Biological investigations of antioxidant and antimicrobial properties of *Thymus satureioides* collected in Tafilalet region, south-east of Morocco. *International Journal of Pharmacy*. 5 (2), 339–346.
- Ramos, V.W., Batista, L.O., Albuquerque, K.T., 2017. Effects of fructose consumption on food intake and biochemical and body parameters in Wistar rats. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 36 (12), 937–941.
- Reddy, S., Akhila, M., Subrahmanyam, C.V.S., Trimurtulu, G., Raghavendra, N.M., 2015. Isolation, *in vitro* antidiabetic, antioxidant activity and molecular docking studies of pentacyclic triterpenoids from *Syzygium alternifolium* (wt.) Walp bark. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 10 (6), 2319–2376. <https://doi.org/10.9790/3008-1062148154>
- Rey, D.P., Ospina, L.F., Aragón, D.M., 2015. Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 44, 72–89. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v44n1.54281>

- Rey Padilla, D.P., 2015. Evaluación del efecto de un extracto de frutos de *Physalis peruviana* sobre algunas carbohidrasas intestinales. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Rodrigo, R., Libuy, M., 2014. Modulation of Plant Endogenous Antioxidant Systems by Polyphenols. *Polyphenols in Plants*. 65-85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397934-6.00005-X>
- Rodríguez, L., 2012. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. *World Journal of Diabetes*. 3 (1), 7. <https://doi.org/10.4239/wjd.v3.i1.7>
- Rodríguez, C.P., Torres, M.C., Aguilar, C.A., Medina, O.N., 2017. Mecanismos inmunológicos involucrados en la obesidad. *Investigación Clínica*. 58 (2), 175–196.
- Sahin, G., Telli, M., Ünlü, E.S., Pehlivan Karakaş, F., 2020. Effects of moderate high temperature and uv-b on accumulation of withanolides and relative expression of the squalene synthase gene in *Physalis peruviana*. *Turkish Journal of Biology*. 44, 295–303. <https://doi.org/10.3906/biy-2002-69>
- Sánchez N., J.C., López Z., D.F., Pinzón D., Ó.A., Sepúlveda A., J.C., 2010. Adipocinas y síndrome metabólico: múltiples facetas de un proceso fisiopatológico complejo. *Revista Colombiana de Cardiología*. 17, 167–176. [https://doi.org/10.1016/s0120-5633\(10\)70236-9](https://doi.org/10.1016/s0120-5633(10)70236-9)
- Sang-Ngern, M., Youn, U.J., Park, E.J., Kondratyuk, T.P., Simmons, C.J., Wall, M.M., Ruf, M., Lorch, S.E., Leong, E., Pezzuto, J.M., Chang, L.C., 2016. Withanolides derived from *Physalis peruviana* (Poha) with potential anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26 (12), 2755–2759. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.077>
- Séro, L., Sanguinet, L., Blanchard, P., Dang, B.T., Morel, S., Richomme, P., Séraphin, D., Derbré, S., 2013. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules*. 18, 14320–14339. <https://doi.org/10.3390/molecules181114320>
- Shanmugasundaram, E.R., Rajeswari, G., Baskaran, K., Kumar, B.R., Shanmugasundaram, K.R., Ahmath, B.K., 1990. Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*. 30, 281–294. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90107-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90107-5)
- Sharma, R., Dave, V., Sharma, S., Jain, P., Yadav, S., 2013. Experimental Models on Diabetes : A Comprehensive Review. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 4, (1) 1–8.
- Shen, Y., Zhang, H., Cheng, L., Wang, L., Qian, H., Qi, X., 2016. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food Chemistry*. 194, 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.083>
- Shi, W., Liu, L., Li, J., Qu, L., Pang, X., Yu, H., Zhang, Y., Wang, T., 2017. Bioactive flavonoids from *Flos Sophorae*. *Journal of Natural Medicine*. 71, 513–522. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1084-7>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent.

- Methods in Enzymology*. 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99017-1)
- Smith, C., Mitchinson, M.J., Aruoma, O.I., Halliwell, B., 1992. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochemical Journal*. 286, 901–905. <https://doi.org/10.1042/bj2860901>
- Soczyńska-Kordala, M., Bakowska, A., Oszmiański, J., Gabrielska, J., 2001. Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 6, 277–281.
- Soler, A., 2009. Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional. Tesis de doctorado. Universitat de Lleida.
- Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S.C., Bergheim, I., 2009. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 50 (4), 1094–1104. <https://doi.org/10.1002/hep.23122>
- Stanley, J., 1995. Síndrome: un concepto en evolución. *Acimed*. 3, 30–38.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., Haeften, T.W. Van, 2005. Pathogenesis of type 2 diabetes.pdf. *Lancet* 365, 1333–1346.
- Tanaka, S., Aida, K., Nishida, Y., Kobayashi, T., 2013. Pathophysiological mechanisms involving aggressive islet cell destruction in fulminant type 1 diabetes. *Endocrine Journal*. 60 (7), 837–845. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0222>
- Tang, Y., Gao, C., Xing, M., Li, Y., Zhu, L., Wang, D., Yang, X., Liu, L., Yao, P., 2012. Quercetin prevents ethanol-induced dyslipidemia and mitochondrial oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 1194–1200. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.008>
- Tankova, T., Chakarova, N., Atanassova, I., Dakovska, L., 2011. Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score as a screening tool for impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and undetected diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 92 (1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.12.020>
- Tariq, S., Imran, M., Mushtaq, Z., Asghar, N., 2016. Phytopreventive antihypercholesterolemia and antilipidemic perspectives of zedoary (*Curcuma Zedoaria* Roscoe.) herbal tea. *Lipids in Health Disease*. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0210-y>
- Toro, R., Aragón, M Ospina, L.F. 2013. Hepatoprotective effect of calyces extract of *Physalis peruviana* on hepatotoxicity induced by CCl₄ in Wistar rats. *Vitae* 20, 125–132. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.12560>
- Toro, R., Arangon, M., 2014. Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de *Physalis peruviana*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Toro, R.M., Aragón, D.M., Ospina, L.F., Ramos, F.A., Castellanos, L., 2014. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activity of calyces from *Physalis peruviana*. *Natural Products Communications*. 9, 1573–1575. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400901111>

- Unnikrishnan, M.K., Veerapur, V., Nayak, Y., Mudgal, P.P., Mathew, G., 2013. Antidiabetic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of the Flavonoids. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 143-161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00013-X>
- Vessal, M., Hemmati, M., Vasei, M., 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*. 135, 357–364. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00140-6)
- Wang, J., Mazza, G., 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophAGEs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (4), 850–857. <https://doi.org/10.1021/jf010976a>
- Wang, Y., Alkhalidy, H., Liu, D., 2021. The emerging role of polyphenols in the management of type 2 diabetes. *Molecules* 26, 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules26030703>
- Wiernsperger, N.F., 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: Revisiting the controversy. *Diabetes & Metabolism*. 29, 579–585. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(07\)70072-1](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70072-1)
- Wu, C.H., Yen, G.C., 2005. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53, 3167–3173. <https://doi.org/10.1021/jf048550u>
- Wu, S.-J., NG, L.-T., Huang, Y.-M., Lin, D.-L., Wang, S.-S., Huang, S.-N., Lin, C.-C., 2005. Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28 (6), 963–966. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.963>
- Wu, S.J., Ng, L.T., Lin, D.L., Huang, S.N., Wang, S.S., Lin, C.C., 2004. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Letters*. 215, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.05.001>
- Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S.L., Sahebkar, A., 2020. Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>
- 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. *Journal of Diabetes Research*. <https://doi.org/10.1155/2008/704045>
- Zhang, X., Zhou, Y., Cheong, M.S., Khan, H., Ruan, C.C., Fu, M., Xiao, J., Cheang, W.S., 2022. *Citri Reticulatae Pericarpium* extract and flavonoids reduce inflammation in RAW 264.7 macrophages by inactivation of MAPK and NF- κ B pathways. *Food Frontiers*. 3 (4), 785–795. <https://doi.org/10.1002/fft2.169>