

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS



**Evaluación de la modulación de la secreción de insulina
en islotes pancreáticos y captación de glucosa en
adipocitos mediado por *Smallanthus sonchifolius* y
*Lupinus mutabilis***

**(Tesis presentada para obtener el grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias
Biológicas y Biomédicas, Mención Biología Celular y Molecular)**

POSTULANTE: Lic. Orlando Mamani Calle
ASESORES: Eduardo Gonzales Dávalos, Ph.D
Silvia Zambrana Santander, M.Sc.

La Paz - Bolivia

2017

Dedicatoria

*A mi familia y las personas que confiaron en mí y me
apoyaron en todo momento*

Tabla de contenido	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Diabetes Mellitus tipo 2	4
3.2. Páncreas	4
3.2.1. Islotes pancreáticos	4
3.3. Célula β pancreáticas.....	5
3.3.1. Canales de K^+ dependiente de ATP	5
3.3.2. Canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje	6
3.3.3. Proteína G.....	6
3.3.4. Protein quinasas	6
3.3.5. Transportador de glucosa (GLUT2).....	7
3.3.6. Gen de la insulina	7
3.4. Mecanismos de secreción de insulina.....	9
3.4.1. Estimulación de secreción de insulina por glucosa.....	9
3.4.2. Vía dependiente del canal de K^+ sensible a ATP.....	9
3.4.3. Vía independiente del canal de K^+ sensible a ATP.....	10
3.4.4. Secreción de insulina y calcio	11
3.4.5. Secreción de insulina e inhibidores.....	11
3.4.6. Maquinaria exocítica de la insulina	12
3.5. Tejido adiposo	13
3.5.1. Tejido adiposo blanco	13
3.5.2. Microambiente del tejido adiposo.....	14
3.5.3. Adipocitos, estructura y función	14
3.5.4. Transportador de glucosa 4 (GLUT4)	15
3.5.5. Captación de glucosa en adipocitos	15
3.5.6. Receptor de insulina y su señalización	16
3.5.7. Señalización IRS/PI 3-Kinasa	16

3.5.8. Señalización de insulina dependiente de PI 3-Kinasa	16
3.6. Resistencia a la insulina	18
3.7. Plantas en estudio	18
3.7.1. <i>Lupinus mutabilis</i> (tarwi).	18
3.7.2. <i>Smallanthus sonchifolius</i> (Yacon).	19
4. DISEÑO METODOLOGICO	21
5. METODOLOGIA	22
5.1. Material Vegetal.	22
5.2. Preparación de extractos.	22
5.3. Animales	22
5.4. Tamizaje Hipoglicemiante	23
5.5. Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG)	23
5.6. Aislamiento de islotes pancreáticos	23
5.7. Evaluación de Secreción de insulina in vitro	24
5.8. Evaluación de secreción de insulina en presencia de inhibidores	24
5.9. Cuantificación de insulina	25
5.10. Aislamiento de Adipocitos primarios murinos	25
5.11. Ensayo de Captación de glucosa	26
5.12. Cuantificación de D(+)Glucosa	26
5.13. Extracción de RNA total	26
5.14. Síntesis de cDNA (DNA complementario)	27
5.15. Cuantificación de expresión génica.	27
5.16. Análisis de resultados.	28
6. RESULTADOS	29
6.1. El extracto <i>Lm70EtOH</i> disminuye el nivel de glucosa plasmática en ratones	29
6.2. El efecto hipoglicemiante de <i>Lm70EtOH</i> es dosis-dependiente	29
6.3. El extracto <i>Ss70EtOH</i> presenta efecto hipoglicemiante en ratones	30
6.4. El efecto hipoglicemiante de <i>Ss70EtOH</i> no es dosis-dependiente	30
6.5. <i>Lm70EtOH</i> y <i>Ss70EtOH</i> disminuyen el nivel de glucosa plasmática en la Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa	31
6.6. <i>Lm70EtOH</i> promueve la secreción de insulina de manera concentración-dependiente	32

6.7. <i>Ss70EtOH</i> no ejerce efecto sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos.....	33
6.8. La secreción de insulina por <i>Lm20</i> es reducida por los bloqueadores de canales de K^+ y Ca^{2+}	34
6.9. La secreción de insulina por <i>Lm20</i> involucra la actividad de PKA y PKC. ..	35
6.10. La captación de glucosa por los adipocitos primarios fue significativa entre 30 – 60 min de incubación	37
6.11. <i>Lm70EtOH</i> promueve la captación de glucosa en adipocitos primarios ..	37
6.12. <i>Ss70EtOH</i> no promueve la captación de glucosa en adipocitos primarios	38
6.13. <i>Lm70EtOH</i> modula la expresión de Ins y Glut2 en islotes pancreáticos murinos.....	38
6.14. <i>Lm20</i> modula le expresión de Insr y Glut4 en adipocitos primarios	40
7. DISCUSION.....	41
8. CONCLUSIONES.....	47
9. RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES	47
10. Agradecimiento	48
11. BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	

Índice de Figuras	Pág.
Figura 1. Diferencias entre islotes humanos y ratones.....	5
Figura 2. Procesamiento postraduccional de insulina	9
Figura 3. Modelo esquemático de secreción de insulina en las células β pancreáticas.....	10
Figura 4. Modelo esquemático de la acción de los inhibidores sobre la célula β pancreáticas.....	12
Figura 5. Modelo esquemático de la maquinaria exocítica en la secreción de insulina	13
Figura 6. Esquema señalización de insulina en adipocitos	17
Figura 7. Tamizaje hipoglicemiante de extractos de <i>L. mutabilis</i>	29
Figura 8. Tamizaje hipoglicemiante del extractos de <i>S. sonchifolius</i>	30
Figura 9. Curva de tolerancia Oral a la Glucosa con diferentes concentraciones dosis del extracto <i>Lm70EtOH</i>	31
Figura 10. Curva de tolerancia Oral a la Glucosa con diferentes concentraciones dosis de <i>Ss70EtOH</i>	32
Figura 11. Efecto de extracto <i>Lm70EtOH</i> sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos.....	33
Figura 12. Efecto de extracto <i>Ss70EtOH</i> sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos.....	33
Figura 13. Efecto de <i>Lm20</i> en la secreción de insulina en presencia de Dx y KCl	34
Figura 14. Efecto de <i>Lm20</i> en la secreción de insulina en presencia de Nifedipine (Nif).....	35
Figura 15. Efecto de <i>Lm20</i> en la secreción de insulina en islotes incubados con inhibidores de PKA y PKC	36
Figura 16. Efecto del extracto <i>Lm70EtOH</i> en la secreción de insulina en presencia de Ptox.....	36
Figura 17. Tamizaje de captación de glucosa en adipocitos primarios	37
Figura 18. Efecto de los extractos sobre la captación de glucosa en adipocitos..	38
Figura 19. Efecto de <i>Lm70EtOH</i> sobre la expresión génica en islotes pancreáticos	39
Figura 20. Efecto de <i>Lm20</i> sobre la expresión génica en islotes pancreáticos con inhibidores.....	39
Figura 21. Efecto de <i>Lm20</i> en la expresión génica de <i>Insr</i> y <i>Glut4</i> en adipocitos primarios	40

Índice de Anexos

Pág.

Anexo 1. Islotes pancreaticos, morfologia y viabilidad celular.....	63
Anexo 2. Curva estándar del ensayo inmuno-enzimatico - insulina	64
Anexo 3. Adipocitos primarios murinos, características y morfologia	65
Anexo 4. Diferencia entre el ensayo de captacion de glucosa con 2-deoxi-glucosa y D(+)-glucosa en adipocitos primarios.....	66
Anexo 5. Certificado de Aval Ético para el trabajo con Animales de experimentación.	67

Abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína quinasa B
ANOVA	Análisis de varianza
AS160	Akt substrate 160
ATP	Adenosina Trifosfato
C/EBT-α	CCTAAT/enhancer binding protein
Cal-C	Calphostin C
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclico
CGA	Ácidos Clorogénicos
CTOG	Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa
DAG	Diacil glicerol
Dx	Diazoxide
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático
GIP	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLUT2	Transportador de Glucosa 2
GLUT4	Transportador de Glucosa 4
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosin Trifosfato
H89	Inhibitor de PKA
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPLC	Cromatografía fina de alta eficacia
HRP	Peroxidasa de Rábano
i.p.	intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato
IRS	Receptor de Insulina
IRS 1/2	Insulin receptor substrate 1/2
KRB	Krebs-Ringer Bicarbonate
KRPH	Krebs-Ringer Phosphate Hepes
Lm	<i>Lupinus mutabilis</i>
Lm20	Lm 20 mg/mL (concentración de <i>Lm70EtOH</i>), también Lm10, Lm5, etc.
Lm70EtOH	Extracto hidroetanólico <i>L. mutabilis</i> (70% etanol)
LmAq	Extracto acuoso <i>L. mutabilis</i> (0% etanol)
LmEtOH	Extracto etanólico <i>L. mutabilis</i> (100% etanol)
LXRα	Liver X Receptor α
MafA	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A

MAPK	MAP-quinasa
mRNA	RNA mensajero
NeuroD1	Neurogenic differentiation1/Beta2
Nif	Nifedipine
p.c.	Peso Corporal
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pdx-1	Pancreatic and duodenal homeobox-1
PI 3K	Fosfatidil inositol 3 kinasa
PIP3	Fosfoinositol Trifosfato
PKA	Protein quinasa A
PKC	Protein quinasa C
Ptox	Pertussis toxina
Shc	Src homology 2 domain containing Soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptors
SNARE	
SREBP-1c	Sterol Response Element Binding Protein-1c
Ss	<i>Smallanthus sonchifolius</i>
Ss20	Ss 20 mg/mL (concentración de <i>Ss70EtOH</i>), también Ss62.5, Ss10, etc.
Ss70EtOH	Extracto hidroetanólico de <i>S. sonchifolius</i> (70% Etanol)
SsAq	Extracto Acuoso de <i>S. sonchifolius</i>
SsEtOH	Extracto etanólico de <i>S. sonchifolius</i> (100% etanol)
STL	Sesquiterpeno lactonas
SUR	Receptor de Sulfonilureas

Resumen

La prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en Bolivia y a nivel mundial se ha incrementado en los últimos años. Las estrategias terapéuticas disponibles presentan en su mayoría efectos adversos, lo que justifica la búsqueda de nuevos agentes hipoglicemiantes. El uso de alimentos naturales en diabetes se ha considerado como una fuente para encontrar nuevos agentes terapéuticos.

El objetivo de esta tesis se centra en evaluar la actividad hipoglicemiante de *Lupinus mutabilis* (Lm) y *Smallanthus sonchifolius* (Ss) a través de la modulación de secreción de insulina en islotes pancreáticos y/o captación de glucosa en adipocitos primarios.

Inicialmente se realizó el tamizaje hipoglicemiante por administración oral de extractos de Lm y Ss en ratones normoglicémicos; los niveles de glucosa plasmática se determinaron a tiempos 0, 1, 2, 4 y 6 horas después de la administración del extracto. Para la CTOG, Lm70EtOH y Ss70EtOH fueron administrados por vía oral, una hora antes de la administración de glucosa (2g/kg p.c.), los niveles de glucosa plasmática se determinaron a tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 min. El efecto de Lm70EtOH sobre la secreción de insulina *in vitro* fue evaluada en islotes pancreáticos murinos, además se incubó con inhibidores para entender las vías involucradas. Por otro lado, adipocitos se incubaron con Lm70EtOH (5, 10 y 20 mg/mL) y 10 mM de glucosa por 30 min. En ambos modelos, se cuantificó la expresión génica por PCR en tiempo real de los genes asociados a la homeostasis de la glucosa.

Lm70EtOH tuvo un efecto reductor, dosis-dependiente (2000-500 mg/kg p.c.) en los niveles de glucosa plasmática. La dosis de 2000 mg/kg p.c. disminuyó de 10.1 ± 0.3 mM (placebo) a 8.0 ± 0.4 mM de glucosa (extracto) ($P < 0.01$) a 1h; el efecto se observó hasta a las 6h después de la administración del extracto de 9.1 ± 0.6 mM (placebo) a 7.1 ± 0.4 mM extracto ($P < 0.001$) y Ss70EtOH (500 mg/kg p.c.) disminuyó el nivel de glucosa a partir de 2h de 11.82 ± 0.4 mM (placebo) a 9.31 ± 0.5 mM ($P < 0,001$). En la CTOG, ambos extractos mejoraron la tolerancia a la glucosa; Lm70EtOH (2000 mg/kg p.c.) disminuyó la glucosa plasmática a 30min (9.39 ± 0.3 mM; $P < 0,05$) vs. placebo, donde la glucosa a 60min fue 5.81 ± 0.3 mM ($P < 0,01$). Con Ss70EtOH (1000

mg/kg p.c.) 30 y 60 min 15.4 ± 0.6 mM ($P < 0,01$) y 12.03 ± 0.8 mM ($P < 0,0001$) respectivamente.

Lm70EtOH aumento la secreción de insulina de 526 ± 33.3 μ UI/mL/islote/h (islotes no tratados) a 1288.3 ± 185.7 μ UI/mL/islote/h ($P < 0,01$) (10 mg/mL) y 2380.1 ± 118.9 μ UI/mL/islote/h ($P < 0,0001$) (20 mg/mL). El mecanismo por el cual *Lm70EtOH* estimulo la secreción de insulina involucro a las quinasas PKA y PKC, además a la vía dependiente de los canales de K^+ y Ca^{2+} . Adicionalmente, *Lm70EtOH* modulo la expresión los genes de *Insulina (Ins)* 3.2 veces mas ($P < 0,00001$) y *transportador de glucosa 2 (Glut2)* 2.7 veces ($P < 0,001$) en islotes pancreáticos murinos. También, se observó una aumento en el consumo de glucosa en adipocitos de 8.88 ± 0.3 mM (CN) a 7.57 ± 0.2 mM ($P < 0,0001$) con 10 mg/mL lo que significa un aumento en la captación de glucosa. Este efecto puede ser explicado por la modulación positiva de la expresión génica del gen *receptor de insulina (Insr)* 0.6 veces más ($P < 0,001$) y *transportador de glucosa 4 (Glut4)*.

En conclusión, la actividad hipoglicemiante de *Lm* está relacionada con secreción de insulina en islotes pancreáticos y la captación de glucosa en adipocitos, además de la expresión de genes relacionados con la homeostasis de la glucosa. Ss ejerce efecto hipoglicemiante no explicado por los mecanismos estudiados.

Palabras claves: diabetes mellitus tipo 2, *Lupinus mutabilis*, *Smallanthus sonchifolius*, islotes pancreáticos, secreción de insulina, adipocitos primarios, captación de glucosa, hipoglicemiante, expresión génica,

Abstract

The prevalence of type 2 diabetes mellitus in Bolivia and worldwide have increased in recent years. The most part of available therapeutic strategies present adverse effects, which justifies the search for new hypoglycemic agents. The use of natural foods in diabetes has been considered as a source to find new therapeutic agents.

The objective of this thesis is to evaluate the hypoglycemic activity of *Lupinus mutabilis* (*Lm*) and *Smallanthus sonchifolius* (*Ss*) through the modulation of insulin secretion in pancreatic islets and/or glucose uptake in primary adipocytes mechanisms.

Initially, hypoglycemic screening was performed by oral administration of *Lm* and *Ss* extracts in normoglycemic mice; plasma glucose levels were determined at 0, 1, 2, 4 and 6 hours after administration of the extract. For CTOG, *Lm70EtOH* and *Ss70EtOH* were administered orally one hour before glucose administration (2g/kg b.w.), plasma glucose levels were determined at 0, 15, 30, 60 and 120 min. The effect of *Lm70EtOH* on *in vitro* insulin secretion was evaluated in murine pancreatic islets, and incubated with inhibitors to understand the pathways involved. On the other hand, adipocytes were incubated with *Lm70EtOH* (5, 10 and 20 mg/mL) and 10 mM glucose for 30 min. In both models, gene expression was quantified by real-time PCR of genes associated with glucose homeostasis.

Lm70EtOH had a dose-dependent reducing effect (2000-500 mg/kg b.w.) on plasma glucose levels. The dose of 2000 mg/kg b.w. decreased from 10.1 ± 0.3 mM (placebo) to 8.0 ± 0.4 mM of glucose (with extract) ($P < 0.01$) at 1 h; The effect was observed up to 6 h after administration of the extract from 9.1 ± 0.6 mM placebo to 7.1 ± 0.4 mM with extract ($P < 0.001$) and *Ss70EtOH* (500 mg/kg b.w.) decreased the glucose level from 2h 11.82 ± 0.4 mM (placebo) at 9.31 ± 0.5 mM ($P < 0.001$). In the CTOG, both extracts improved glucose tolerance; *Lm70EtOH* (2000 mg/kg b.w.) decreased plasma glucose to 30min (9.39 ± 0.3 mM; $P < 0.05$) vs. placebo, where the glucose at 60min was 5.81 ± 0.3 mM ($P < 0.01$). With *Ss70EtOH* (1000 mg/kg b.w.) at 30 min 15.4 ± 0.6 mM ($P < 0.01$) and 60 min 12.03 ± 0.8 mM ($P < 0.0001$) respectively.

Lm70EtOH increased insulin secretion from 526 ± 33.3 μ UI/mL/islet/h (untreated islets) to 1288.3 ± 185.7 μ UI/mL/islet/h ($P < 0.01$) (10 mg/mL) and 2380.1 ± 118.9 μ UI/mL/islet/h

($P < 0.0001$) (20 mg/mL). The mechanism by which *Lm70EtOH* stimulated insulin secretion involved the PKA and PKC kinases, in addition to the K^+ and Ca^{2+} channels dependent pathway. Additionally, *Lm70EtOH* modulates the Insulin (*Ins*) 3.2 times more ($P < 0.00001$) and glucose transporter 2 (*Glut2*) 2.7 times ($P < 0.001$) gene expression in murine pancreatic islets. In addition, an increase in glucose consumption in adipocytes from 8.88 ± 0.3 mM (NC) to 7.57 ± 0.2 mM ($P < 0.0001$) was observed with 10 mg/mL which means an increase in glucose uptake. This effect can be explained by the positive modulation of the gene expression of the insulin receptor gene (*Insr*) 0.6 times more ($P < 0.001$) and glucose transporter 4 (*Glut4*).

In conclusion, the hypoglycemic activity of *Lm* is related to insulin secretion in pancreatic islets and glucose uptake into adipocytes, in addition to the expression of genes related to glucose homeostasis. *Ss* exerts hypoglycemic effect not explained by the mechanisms studied.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, *Lupinus mutabilis*, *Smallanthus sonchifolius*, pancreatic islets, insulin release, primary adipocytes, glucose uptake, hypoglycemic, gene expression.

1. INTRODUCCIÓN

La prevalencia de diabetes mellitus se ha incrementado rápidamente en los últimos años a nivel mundial. De acuerdo a la International Diabetes Federation (IDF) el número de personas con diabetes en el mundo fue aproximadamente 346 millones y se estima que para el año 2030 se incrementaría a 552 millones de enfermos (Whiting et al, 2011). La diabetes mellitus tipo 2 representa el 90% de todos los casos de Diabetes, y está muy relacionada al estilo de vida de las personas, la obesidad, factores genéticos y epigenéticos, etc. (Kahn et al., 2014; Miller et al., 2008; Olsson et al., 2014; Wajchenberg & Cohen, 2014). En América Latina se convirtió en un problema mayor ya que representa una pesada carga el costo de tratamiento en la sociedad. No solo es el gasto en el tratamiento y los cuidados respectivos, también indirectamente como la pérdida de productividad y la mortalidad prematura (Barceló & Rajpathak, 2001).

En Bolivia, la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 se ha incrementado considerablemente en los últimos años, debido a cambios de estilo de vida y hábitos alimenticios en la población (Barceló & Rajpathak, 2001). En los últimos cinco años, el registro de casos de diabetes en el país se incrementó en un 30%, de 64,136 en 2010 a 89,916 casos en 2015, con aumento de 8% por año de 83,000 casos en 2014 a 90,000 casos en 2015. Se prevé que hasta el 2020 la cifra de casos con esta enfermedad se duplique y llegue a 180 mil, según informes del Ministerio de Salud 2015 (PaginaSiete, 2016). Santa Cruz es el departamento con mayor incidencia de la enfermedad con 35,300 casos; seguido de La Paz, con 15,495 y Cochabamba con 13,453 (La Razon, 2015).

Las causas principales son relacionadas al sobrepeso y/o la obesidad debido a que estos son factores predisponentes a la diabetes mellitus tipo 2 (Stienstra et al., 2014; Yang et al., 2013). Si bien existen estrategias terapéuticas para el tratamiento de la diabetes tipo 2, muchos de ellos presentan efectos secundarios, como hipoglicemia y sobrepeso, que manifiestan la necesidad de la búsqueda de nuevos tratamientos coadyuvantes o alternativos a la actual terapia.

Bolivia tiene una gran diversidad de mesetas ecológicas que son una fuente potencial de productos de origen natural con propiedades medicinales. Son las

culturas nativas de estas regiones quienes han mantenido su conocimiento ancestral durante varias generaciones y ofrecen información oral de los beneficios de su uso. Así, varias plantas y semillas han venido siendo utilizadas por sus propiedades nutricionales y en los últimos años han sido aplicadas para el tratamiento alternativo de la diabetes y sus complicaciones (Jacobsen et al, 2006; Valentová & Ulrichová, 2003).

A pesar de ser un país con riqueza alimenticia grande, no se tienen documentados los beneficios de estos en la salud. Se conoce de granos, cereales y tubérculos de uso común alimenticio con actividad anti-diabética, entre ellos: *Lupinus mutabilis* y *Smallanthus sonchifolius*, pero los mecanismos por el cual ejercen beneficios sobre la diabetes mellitus tipo 2 son poco conocidos.

En este sentido se planteó estudiar la propiedad anti-diabética de plantas alimenticias (nutraceúticos) en modelos animales y celulares (islotos pancreáticos y adipocitos primarios); que por usos tradicionales refieren efecto hipoglicemiante, *Lupinus mutabilis* y *Smallanthus sonchifolius* (Baldeón et al., 2012; Delgado et al., 2013; Fornasini et al., 2012; Habib et al., 2011; Jacobsen et al., 2006; Oliveira et al., 2013; Pedreschi et al, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad hipoglicemiante de los extractos acuoso, hidroetanólico y etanólico de *L. mutabilis* y *S. sonchifolius* en modelos animales y celulares.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad hipoglicemiante de los extractos acuoso, hidroetanólico y etanólico de semillas *L. mutabilis* y tubérculos de *S. sonchifolius* en ratones Swiss albino.
- Evaluar el efecto del extracto con mayor actividad de *L. mutabilis* y *S. sonchifolius* sobre la curva de tolerancia a la glucosa en ratones Swiss albino.
- Evaluar el efecto de *L. mutabilis* y *S. sonchifolius* sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratones Swiss albino.
- Determinar el mecanismo de acción por el cual *L. mutabilis* y *S. sonchifolius* promueven la secreción de insulina empleando bloqueadores de canales de K^+ y Ca^{2+} .
- Determinar el mecanismo de acción por el cual *L. mutabilis* y *S. sonchifolius* promueven la secreción de insulina empleando inhibidores de vías de transducción mediadas por PKA, PKC y Proteína G.
- Determinar los niveles de expresión génica de los mediadores de moleculares en la secreción de insulina mediante PCR en tiempo Real, insulina y transportador de glucosa 2.
- Evaluar el efecto de *L. mutabilis* y *S. sonchifolius* sobre la captación de la glucosa en adipocitos primarios.
- Determinar los niveles de expresión génica de los mediadores de moleculares en la captación de glucosa mediante PCR en tiempo real, transportador de glucosa 4 y receptor de insulina.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Diabetes Mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad provocada por un desorden metabólico crónico en el organismo, con un incremento de casos reportados en todo el mundo. Se caracteriza por hiperglicemia, resistencia a la insulina y deficiencia relativa de insulina. Además resulta de la interacción entre factores genéticos, medioambientales y estilo de vida, la inactividad física, sedentarismo, consumo de cigarro y alcohol (Olokoba et al., 2012). Los posibles blancos terapéuticos están ligados a la vía de secreción de insulina por los islotes pancreáticos (sulfonilureas), captación de glucosa en tejidos periféricos (miocitos y adipocitos) (glitazonas), disminución de la gluconeogénesis y glucogenólisis en los hepatocitos y disminución de la absorción de glucosa intestinal (metformina) (Ashcroft, 1996; Hauner, 2002; Song, 2016).

3.2. Páncreas

El páncreas es una glándula endocrina y exocrina. La porción exocrina comprende de tejido acinar responsable de la secreción de enzimas digestivas en el jugo pancreático. La porción endocrina está representada por los islotes pancreáticos, con sus diversas células que secretan péptidos con funciones diferentes (In't Veld et al, 2010).

3.2.1. Islotes pancreáticos

Los islotes de Langerhans son un acumulo de tejido endocrino que ocupan aproximadamente 1-2% del total de tejido pancreático (Filipsson et al, 2001; In't Veld et al, 2010). El tamaño de islotes humanos y murinos son similares, pero existen algunas diferencias entre las características de los islotes pancreáticos humanos y murinos, por ejemplo las células β (productoras de insulina) son del 50-70% en humanos y 60-80% en ratones. Las células α (productoras de glucagón) del 20-40% en humanos y 10-20% en ratones. El ratio entre células β y células α es mayor en ratones comparados al islote humano. Las células δ (productoras de somatostatina) y células PP (productoras de polipéptido pancreático) son alrededor del 10% en humanos y 5% en ratones. Finalmente, las células épsilon (producen la grelina) son menos del 1% (Cabrera et al., 2006; Dolenšek et al, 2015; Steiner et al, 2010). En

ratones las células β se encuentran en la parte central y las células α en el borde de los islotes, mientras en humanos la distribución de las células β es irregular lo que influirá en su respuesta al aumento de la glucosa (Cabrera et al., 2006; Kim et al., 2009) (Figura 1).

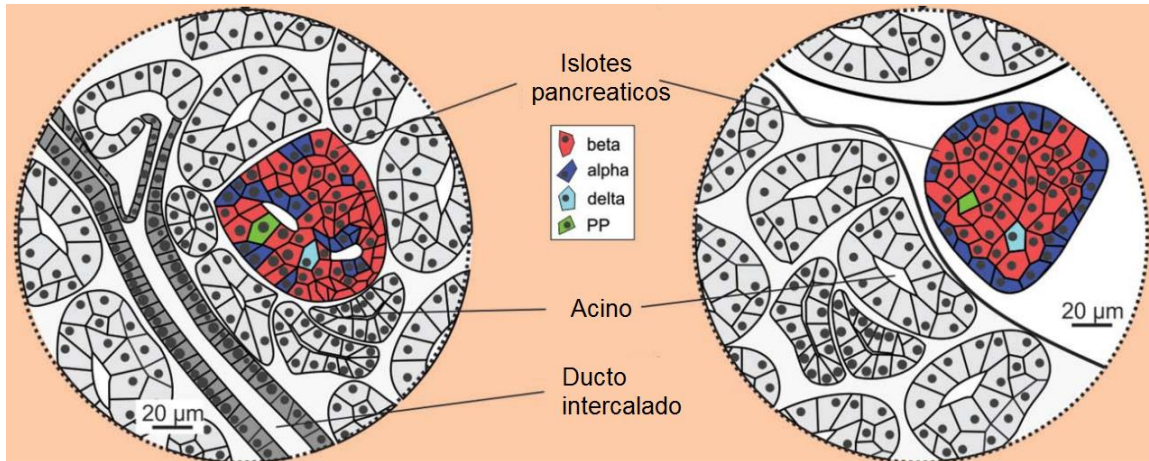


Figura 1. Diferencias entre islotes humanos (izq) y ratones (der). Fuente: Dolensek, 2015

3.3. Célula β pancreáticas

Estas células están altamente especializadas para controlar la producción, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de insulina en respuesta a moléculas insulínótropas (Lazo de la vega & Fernández, 2009). De esta manera mantienen los niveles de insulina adecuados en el organismo para el metabolismo de la glucosa. La producción de insulina es alterada en Diabetes mellitus tipo 1, debido a la destrucción autoinmune de la célula β ; en la diabetes mellitus tipo 2 por fallas multifactoriales complejas, por ejemplo: disminución de producción de insulina debido al estrés en respuesta a la resistencia a la insulina, disminución de la masa celular, etc. (Lacy, 2010; Leibiger et al, 2008).

3.3.1. Canales de K^+ dependiente de ATP

Las células β pancreáticas expresan en su membrana canales de K^+ dependientes de ATP (Cook & Hales, 1984), así también expresan los miocitos (musculo liso y esquelético), cerebro, riñón. Muchos estudios han demostrado que los canales de K^+ dependiente a ATP son heteromultímeros de dos diferentes subunidades: Una subunidad de 145 kD que une a sulfonilurea (SURx) (Aguilar-Bryan et al, 1995) y una pequeña subunidad de 36 kD el cual pertenece a la familia de proteínas Kir (Kir6.x) (Inagaki et al , 1995). Dos isoformas de SURx han sido identificados SUR1 y SUR2.

SUR1 exhibe alta afinidad de unión a sulfonilurea y está presente en células neuroendocrinas y células β pancreáticas (Aguilar-Bryan, 1995). Las subunidades Kir forman el poro de los canales de K^+ dependiente de ATP; la isoforma Kir6.2 es altamente expresada en islotes pancreáticos y líneas celulares productoras de insulina (Inagaki et al, 1995). Las sulfonilureas cierran los canales de K^+ dependiente de ATP, provocando un incremento en la secreción de insulina por las células β (Lippiat et al, 2002) (Figura 3).

3.3.2. Canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje

Los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje juegan un papel importante en el estímulo de secreción de insulina en las células β , principalmente para el incremento de Ca^{2+} intracelular (Straub & Sharp, 2002). Estos canales son activados de acuerdo a las fluctuaciones de potenciales en la membrana celular (actividad eléctrica), el cual se inicia por el cierre de los canales de K^+ dependiente de ATP (Braun et al., 2008; Satin & Cook, 1985).

3.3.3. Proteína G

Las proteínas de unión a GTP (proteínas G) juegan un papel importante en varios procesos celulares. Estas median procesos de transducción de señal por hormonas en las células endocrinas. Existen subclases de proteínas G con diferentes funciones celulares, así como G_i (proteína que media la inhibición de la adenilato ciclasa), G_t (abre los canales de K^+), además de otras como ser: G_o , G_{pla} , G_{plc} y G_e con funciones específicas. Algunas subclases de proteína G presentes en células β pancreáticas juegan un papel importante en la secreción de insulina dependiente de la señalización de proteína G, entre ellas están las proteínas G_i y G_e . Las proteínas G_e principalmente han sido funcionalmente ligadas a la exocitosis de la insulina (Hoa et al, 2004; Hoa et al., 2007).

3.3.4. Proteína quinasa

Existen dos quinasa de proteínas involucradas en la secreción de insulina. Proteína quinasa A es un heterotetrámero compuesto por 2 subunidades regulatorias y 2 catalíticas (Gao et al., 2002; Neshet et al., 2002). En las células β pancreáticas, la vía de señalización iniciada por incretinas: GIP y GLP-1 inician la señalización a través de la proteína $G_s\alpha$, derivando en la activación de la adenilato ciclasa, que incrementa

la producción de cAMP (Efendic et al., 2002; Yajima et al., 1999). El aumento de cAMP potencia la secreción de insulina a través de la actividad de PKA y el aumento de Ca^{2+} (Seino, 2005).

Protein quinasa C, es una serina/treonina quinasa, con una familia que comprende de 10 isoformas distribuidas en diferentes tejidos, con funciones específicas (Bastani et al., 1995; Bosch et al., 2004; Hashimoto et al., 2005; Shigeto et al., 2015; Wang et al., 2012). Esta quinasa es activada a través de la señalización continuada por DAG para iniciar la secreción de insulina por las células β (Biden et al., 2010; Kang et al., 2006). Las isoformas de PKC juegan importantes papeles en un gran número de procesos celulares, desde funciones fisiológicas, tal como el crecimiento celular y diferenciación, proliferación, expresión génica, transducción de señal, secreción y exocitosis, contracción muscular (Bastani et al., 1995; Biden et al., 2010; Kim et al., 2001). También está asociado con la homeostasis de glucosa en los islotes pancreáticos, hígado, tejido adiposo, músculo esquelético (Ahmed et al., 2015; Biden et al., 2010).

3.3.5. Transportador de glucosa 2 (GLUT2)

El transportador de glucosa 2 es una proteína de membrana que facilita el ingreso de glucosa en células de mamíferos. El gen de GLUT2 se expresa en hígado, intestino delgado, riñón y células β pancreáticas (Waeber et al., 2014). En la expresión génica de GLUT2, varios factores de transcripción como; MafA (*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A*), Pdx-1 (*pancreatic and duodenal homeobox-1*) activan la transcripción del gen de la insulina (Lazo de la vega & Fernández, 2009). La actividad de estos factores de transcripción son glucosa dependiente al igual que la expresión del gen de la insulina (Dai et al., 2012; Pang et al., 1994).

3.3.6. Gen de la insulina

En los mamíferos la insulina está codificada específicamente en las células β de los islotes pancreáticos. En la mayoría de las especies la insulina existe como único gen, mientras que en rata y ratón se tiene dos genes no-alélicos. En humanos, el gen de insulina está localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (p15.5); mientras que en ratas los genes de insulina I y II son co-localizados en el cromosoma 1 y en ratones se localiza en dos diferentes cromosomas: gen de insulina I en el cromosoma 19 y

gen de insulina II en el cromosoma 7. El gen de la insulina II murinos y gen de insulina humano contiene 3 exones y 2 intrones, el gen de insulina I no tiene el segundo intrón (Melloul et al, 2002a).

La expresión génica del gen de la insulina, estimulada por la glucosa es potenciada por su promotor que tiene sitios de unión a factores de transcripción; A3, E1 y C1, los cuales son unidos por Pdx-1, NeuroD1 (neurogenic differentiation1)/Beta2 y MafA respectivamente (Andrali et al, 2008; Lazo de la vega & Fernández, 2009; Melloul et al., 2002a), estos tres factores de transcripción actúan sinérgicamente para promover la expresión del gen de la insulina en respuesta a la glucosa (Mazzucato et al., 2012; Andrali et al., 2008; Kataoka et al., 2002; C. Zhang et al., 2005; Zhao et al., 2005). Además de los coactivadores transcripcionales, como p300 que afecta a la estructura de la cromatina. (Melloul et al, 2002b; Poitout et al., 2006).

La insulina es inicialmente sintetizada como un polipéptido de 110 aminoácidos, conocido como pre-insulina. Este precursor contiene 24 aminoácidos hidrofóbicos, y en su extremo N-terminal se encuentra el péptido señal que es removido durante la translocación del citoplasma al retículo endoplásmico, derivando en la proinsulina el cual comprende de las cadenas A, B y C con tres uniones de disulfuro. La proteólisis de la proinsulina en las vesículas secretoras por las convertasas pro-hormona (PC1 y PC2) y carboxipeptidasa E, remueven parte del péptido C del resto de la molécula, manteniendo las uniones disulfuro. Esta parte restante es conocida como insulina madura, consta de 21 aminoácidos en su cadena A y 30 aminoácidos en la cadena B (In't Veld et al., 2010) (Figura 2).

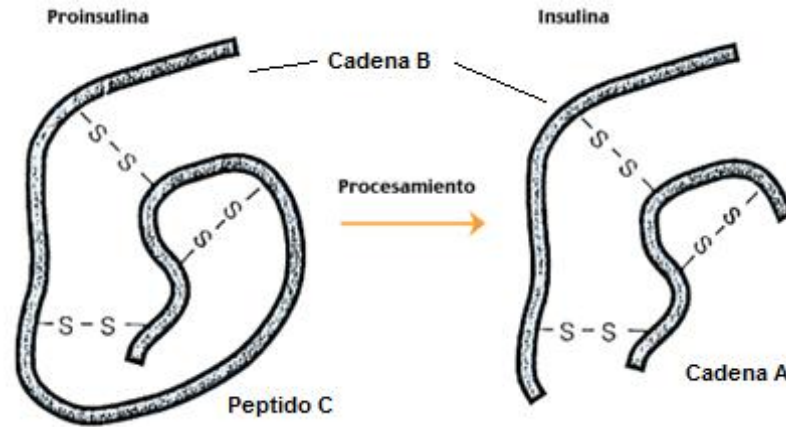


Figura 2. Procesamiento posttraduccional de insulina. Fuente:
http://www7.uc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMlval2.1.1.4.6.html

3.4. Mecanismos de secreción de insulina

Existen dos vías de secreción de la insulina, una vía es dependiente de los canales de K^+ , que libera la insulina previamente sintetizada y almacenadas en vesículas secretorias y la otra vía es independiente de los canales de K^+ , que activa la síntesis de insulina para ser secretadas en la segunda fase de la secreción de insulina.

3.4.1. Estimulación de secreción de insulina por glucosa

En concentraciones bajas de glucosa (3-5 mM glucosa) existe un nivel basal de secreción de insulina, para mantener la homeostasis de la glucosa. Esta secreción se incrementa cuando la concentración de glucosa es elevado (10-25 mM glucosa), durante el periodo postprandial principalmente, en las condiciones de glucosa elevada las células β secretan gran cantidad de insulina hacia la circulación (Henquin, 2000; Jitrapakdee et al, 2002).

3.4.2. Vía dependiente del canal de K^+ sensible a ATP

Esta es una de las vías más importantes para la secreción de insulina dependiente de glucosa en la célula β . La glucosa entra a las células β a través del transportador de glucosa 2 (GLUT2) en ratones (Chen et al., 1990) y transportador de glucosa 1 (GLUT1) en humanos (Vos et al., 1995). Los transportadores GLUT permiten el transporte de alta capacidad y baja afinidad necesario para equilibrar las concentraciones de glucosa a través de la membrana y ayudar a mantener un ritmo alto de metabolismo en las células β (Jitrapakdee et al., 2002). La glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G6P) por la glucoquinasa; posteriormente sigue con las etapas de la glucólisis y de la oxidación de glucosa, para generar ATP, por lo

tanto existe un incremento el ratio intracelular de trifosfato de adenosina/difosfato de adenosina (ATP/ADP). Esto provoca el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP, causando la despolarización de la membrana celular de las células β , además provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El Ca^{2+} extracelular entra en las células β , incrementándose así los niveles de Ca^{2+} citosólico suficientes para estimular la liberación de las vesículas que contiene insulina, vía excitocitosis (Muio & Newgard, 2008) (Figura 3).

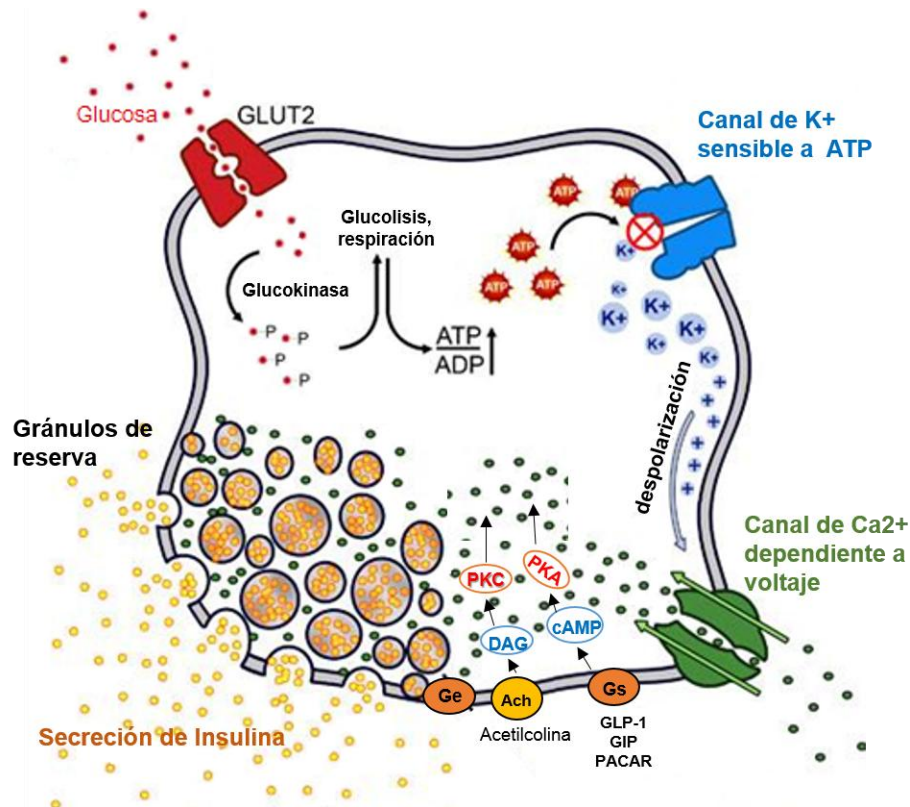


Figura 3. Modelo esquemático de secreción de insulina en las células β pancreáticas. Fuente: *Beta Cell Biology Consortium*, 2004 modificado.

3.4.3. Vía independiente del canal de K^+ sensible a ATP

Existen otros segregatogicos de insulina que tienen efecto en las células β . Por ejemplo tenemos a las hormonas gástricas, también llamadas incretinas, así como el polipéptido insulínotropico dependiente de glucosa (GIP *del inglés*, Glucose-dependent insulintropic polypeptide) y péptido similar a Glucagón (GLP-1, *del inglés* Glucagon-like peptide) que son liberados después de la ingesta de alimentos (Macdonald et al., 2002). Estos potencian la secreción de insulina gracias al incremento de cAMP por activación con el adenilato ciclasa después de la ingestión

de comida (Macdonald et al., 2002; Muoio & Newgard, 2008; Nauck, 1998). Otros estímulos provenientes del sistema nervioso, como el parasimpático potencian la secreción de insulina debido a la unión de la acetilcolina a su receptor en los islotes pancreáticos. Esta estimulación involucra la activación de la fosfolipasa C, se genera IP_3 y DAG, estos segundos mensajeros activan diferentes vías involucradas en la secreción de insulina; por ejemplo, IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático y DAG activa a la proteína quinasa C (Barker et al, 2002). Además, existen otros nutrientes como los aminoácidos (Vega-monroy & Fernandez-mejia, 2011) y ácidos grasos libres que regulan la secreción de insulina, por ejemplo, la leucina y alanina que son metabolizados y generan incremento de ATP (Vega-monroy & Fernandez-mejia, 2011) (Figura 3).

3.4.4. Secreción de insulina y calcio

Un incremento de la concentración libre de Ca^{2+} citosólico activa muchos procesos celulares, así como también ocurre la activación de la secreción de insulina en las células β . Muchos de los experimentos *in vitro*, demostraron que la concentración de Ca^{2+} citosólico es ~20 -100 nM, mientras que la concentración extracelular es ~1-2 mM. Los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje regulan la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular dentro de las células β para la secreción de insulina a través de la activación de la maquinaria exocítica (Srivastava et al., 1999).

3.4.5. Secreción de insulina e bloqueadores

Algunos bloqueadores tienen efecto específico en alguna vía relacionada con la secreción de insulina en las células β . Diazoxide (Dx) es un fármaco que mantiene abierto los canales de K^+ dependiente de ATP, por lo tanto la secreción de insulina es disminuida (Trube et al, 1986). Nifedipine (Nif) actúa bloqueando los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente, suprimiendo el ingreso de Ca^{2+} necesario para la secreción de insulina en las células β (Straub & Sharp, 2002). H89 y Calphostin-C (Cal-C) son inhibidores de las proteína quinasas A y C respectivamente (Bruns et al., 1991; Filipsson et al, 1998; Thams et al, 2005; Thams & Capito, 2001), estas quinasas juegan un papel importante en la secreción de insulina independiente de los canales de K^+ y se activan mediante señalización de segundos mensajeros así como cAMP y DAG. Pertusis toxina inhibe reversiblemente la secreción de insulina dependiente de

proteína G_i y G_e vía ADP-ribosilación (Hoa et al., 2007; Komatsu et al., 2002) (Figura 4).

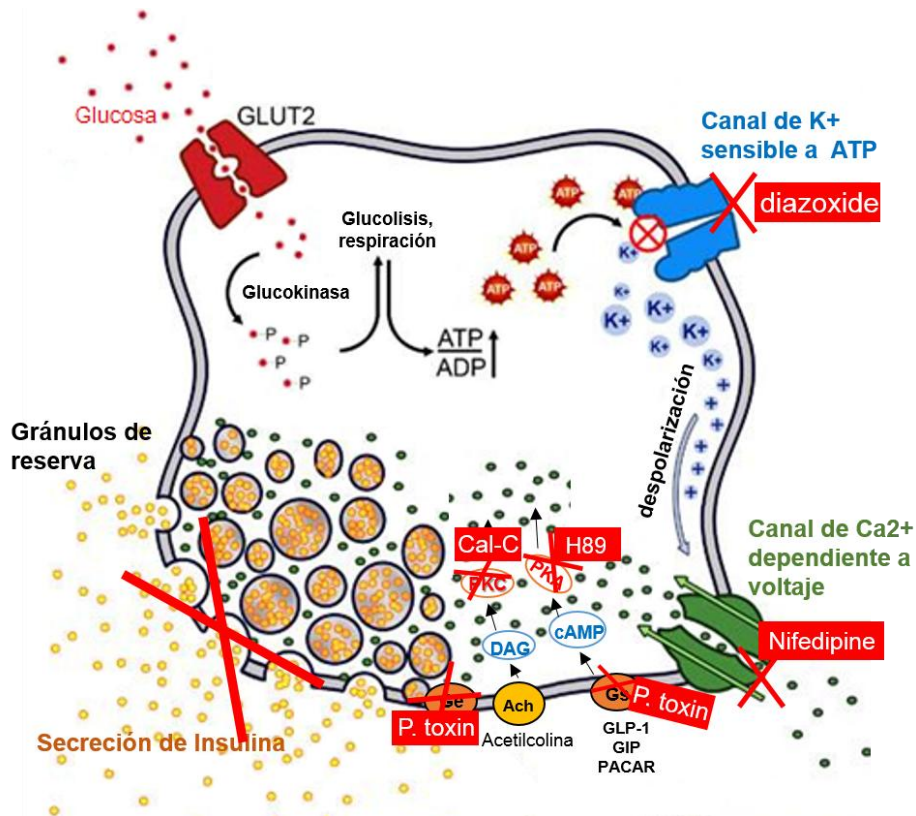


Figura 4. Modelo esquemático de la acción de los inhibidores sobre la célula β pancreática. Fuente: *Beta Cell Biology Consortium*, 2004 modificado.

3.4.6. Maquinaria exocítica de la insulina

El proceso de exocitosis concierne de tráfico y fusión de las vesículas que contienen la insulina con la membrana plasmática, es un proceso fundamental regulado por una maquinaria diversa de interacción proteína-proteína (Li & Chin, 2003). Funcionalmente está dividido en 4 etapas: anclaje, unión, cebado y fusión. Anclaje es la etapa de la formación del complejo SNARE (soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptors), las proteínas se unen a los lugares de unión en la membrana. Unión, comprende de vesículas cerca de la membrana con distancias $\leq 30-50$ nm, durante esta etapa puede ser disociado. La subfamilia GTPasa monomérica Rab27 y efectores Rab han sido recientemente propuestos que regulan las etapas anclaje y unión. Cebado, es un proceso ATP dependiente, una etapa donde se establece el complejo trans-SNARE para fusionarse. La última etapa ocurre cuando las vesículas se fusionan y se abren hacia afuera de la célula. En las células

de mamíferos se expresan más de 30 diferentes proteínas SNARE y están clasificados en dos grupos: v(vesicle)- y t(target)-SNAREs dependiendo de su localización (Valladolid-Acebes et al., 2015; Wang & Thurmond, 2009) (Figura 5).

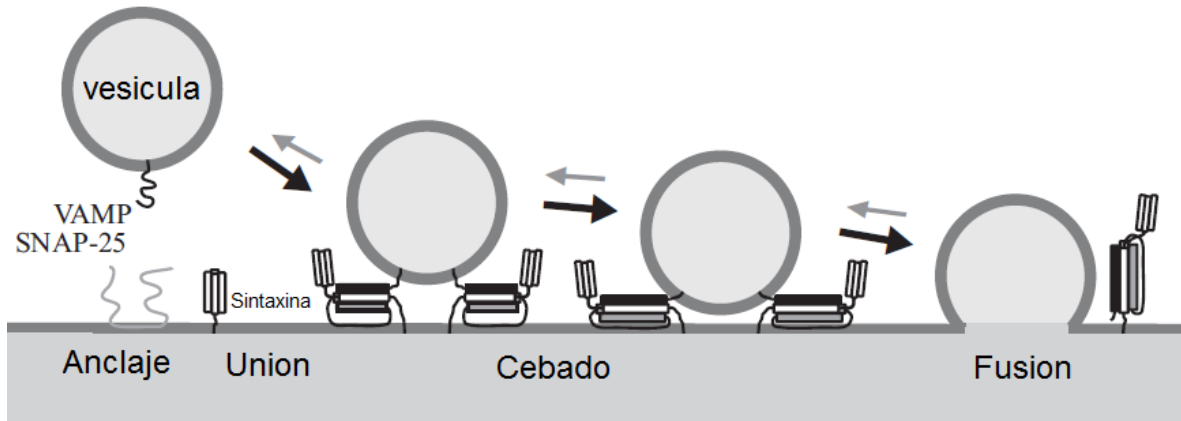


Figura 5. Modelo esquemático de la maquinaria exocítica en la secreción de insulina. Fuente: Johansson, 2007 modificado.

3.5. Tejido adiposo

El tejido adiposo muy conocido por su alta capacidad para almacenar energía en forma de los acúmulos de grasa en el cuerpo. Actualmente se conoce también como un órgano metabólicamente complejo y activo que secreta citoquinas con importante función endocrina, principalmente relacionado con la diabetes mellitus tipo 2, inflamación y la obesidad (Chawla et al., 2011; Davies & Philip, 2015; Qiu, et al., 2016; Rajan & Longhi, 2016; Stienstra et al., 2014; Weisberg et al., 2003). Existen dos tipos de tejido adiposo en los mamíferos: tejido adiposo blanco y pardo. La principal función del tejido adiposo pardo es generar el calor corporal (Kershaw & Flier, 2004).

3.5.1. Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco está presente en mayor cantidad, y se localiza en diferentes lugares del organismo; tiene diferentes funciones tal como el almacenamiento de energía, señalización hormonal y de la insulina, metabolismo de la glucosa, mantenimiento de la homeostasis de lípidos, entre otros. Existen dos tipos de tejido adiposo blanco; el tejido adiposo subcutáneo el cual está localizado en la periferia debajo de la piel, y el otro tipo él es tejido adiposo blanco visceral, es el que cubre a

los órganos internos. El tejido adiposo blanco visceral es metabólicamente más activo, donde se observa mayor transporte y flujo de ácidos grasos que se liberan directamente a la circulación portal y al hígado (Bruce, 2014; Kershaw & Flier, 2004).

3.5.2. Microambiente del tejido adiposo

Dentro del microambiente del tejido adiposo blanco tenemos una gran cantidad de células con actividades diferentes y muy importantes. Las células progenitoras de adipocitos se encuentran en la fracción vascular estromal (SVF, *del inglés* stromal vascular fraction) e incluye a las células madre mesenquimales y preadipocitos. Los macrófagos son un componente natural y esencial, su principal función es eliminar células afectadas por infección a través de la fagocitosis y la liberación de citoquinas (Gordon & Taylor, 2005; Muoio & Newgard, 2008). Cuando el tejido adiposo se expande, los macrófagos proliferan y secretan citoquinas pro-inflamatorias (macrófagos M1), promoviendo a la resistencia a la insulina tanto a nivel local y sistémico. Además existen otros tipos celulares: células endoteliales, linfocitos, mastocitos, fibroblastos y leucocitos (Davies & Philip, 2015; Geem et al., 2012; Qiu et al., 2016; Weisberg et al., 2003).

3.5.3. Adipocitos, estructura y función

Los adipocitos son un tipo celular más abundante del cuerpo y representan aproximadamente del 20-40% en el tejido adiposo, pero ocupan cerca al 90% del volumen del tejido. La mayor parte de su citoplasma está ocupado por gotas de grasa conteniendo triglicéridos, colesterol, etc. Su núcleo se encuentra en un extremo, adyacente a la membrana celular, además de escasa cantidad de mitocondrias (Yang, 2008).

Las principales funciones de los adipocitos son mantener la reserva de energía después de las comidas y liberación de energía entre las comidas y en ayunas. Esta función es llevada a cabo por dos procesos denominados, lipogénesis y lipólisis respectivamente mediado por la insulina (Yang, 2008).

Después de las comidas, los ácidos grasos son almacenados en forma de triglicéridos dentro de las gotas de grasa de los adipocitos, este proceso es denominado lipogénesis. La mayor fuente que contribuye la lipogénesis es la dieta de donde se realiza la captación de ácidos grasos libres de la sangre para la síntesis de

triglicéridos; este proceso es insulina dependiente, el cual es liberado en respuesta a la elevada concentración de glucosa (Frayn, 2010). En condiciones de ayunas y tiempos prolongados entre comidas, la energía se obtiene del metabolismo de los adipocitos y ser liberado en forma de ácido graso, para su metabolismo en el tejido muscular. La lipólisis basal ocurre continuamente en bajas cantidades dentro los adipocitos (Rosen & Spiegelman, 2014).

3.5.4. Transportador de glucosa 4 (GLUT4)

GLUT4 es una proteína de membrana dependiente de insulina que transporta glucosa hacia las células. Es controlada por el estatus metabólico, nutricional y hormonal tejido específico y es expresada principalmente en células de musculo, tejido adiposo y corazón. Es la vía responsable de la captación de glucosa en musculo y adipocitos estimulado por insulina (Im et al., 2007). En tejido adiposo y musculo, muchos factores de transcripción están envueltos en la regulación de expresión génica de *Glut4*, entre ellos: C/EBP- α (CCAAT/enhancer Binding Protein), SREBP-1c (Sterol Response Element Binding Protein-1c), LXR α (Liver X Receptor α) (Im et al., 2007). La transcripción de *Glut4* en tejido adiposo es disminuida en modelo insulino-deficiente y diabetes de tipo 2 (Carvalho et al, 2005)..

3.5.5. Captación de glucosa en adipocitos

GLUT4 es la isoforma que tiene mayor actividad en el transporte de glucosa en tejido muscular y adiposo y que se redistribuye en forma dinámica en la membrana celular y en vesículas citoplasmáticas (Leney & Tavaré, 2001); en las células no estimuladas, la mayoría de GLUT4 se encuentran dentro de las membranas intracelulares (vesículas), solo con <5% del total de GLUT4 presentes en la membrana plasmática (Hashiramoto & James, 2000; Kupriyanova et al., 2002). Después del estímulo con insulina más del 50% del total de GLUT4 se exponen sobre la membrana plasmática (Govers, 2014). La glucosa ingresa con mayor afinidad a través de los transportadores GLUT4 en los adipocitos, y también a través de las GLUT1 que provee el estado basal de glucosa (Al-hasani et al, 1999; Huang & Czech, 2007). La captación de glucosa en adipocitos promueve la lipogénesis, debido al incremento del metabolismo de glucosa y generación de Acetil-Coa a través de la glucólisis (Wilcox, 2005).

3.5.6. Receptor de insulina y su señalización

El receptor de la insulina en humanos, un heterodímero, está compuesto de dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana. La subunidad α contiene un dominio de unión a ligando extracelular que regula la actividad tirosina quinasa de las subunidades β (Lin & Sun, 2010). Las subunidades β son activadas por autofosforilación cuando la insulina se une a su receptor, esta activación provee un sitio de unión de varias moléculas corriente debajo de señalización, incluyendo las proteínas Shc, Grb2 y el substrato del receptor de insulina (IRS, *del inglés* insulin receptor substrate). Esta cascada de señalización converge afectando rutas metabólicas y vías regulatorias/mitogénicas. Cuando IR es activado, recluta a IRS el cual se une al residuo fosforilado. Al unirse, se activa por acción de la actividad tirosina quinasa de la IRS (Danielsson et al., 2005) (Figura 6).

3.5.7. Señalización IRS/PI 3-Kinasa

Una vez activados tanto IRS-1 y IRS-2, interaccionan con PI 3-K y Grb2. Estas proteínas son las primeras moléculas de las dos vías principales de señalización de la insulina: la vía PI 3-K-AKT que conduce a la traducción de proteínas, control metabólico, ciclo celular; la otra es la vía de las Ras-MAPK que controla el crecimiento celular y la diferenciación (Belfiore et al, 2009; Siddle, 2011) (Figura 6).

3.5.8. Señalización de insulina dependiente de PI 3-Kinasa

Las moléculas de membrana PIP₂ son convertidas a PIP₃ por la actividad de la PI3-Kinasa. La PI3-Kinasa está compuesto de una subunidad regulatoria y una subunidad catalítica, que fosforila la posición 3`OH del fosfatidil inositol en la membrana plasmática, generando fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP₃). Estos PIP₃ generados son específicamente reconocidos por proteínas que contienen dominios PH (Plekstrin Homology), el cual esta redistribuido en la membrana plasmática (Ueki et al., 1998).

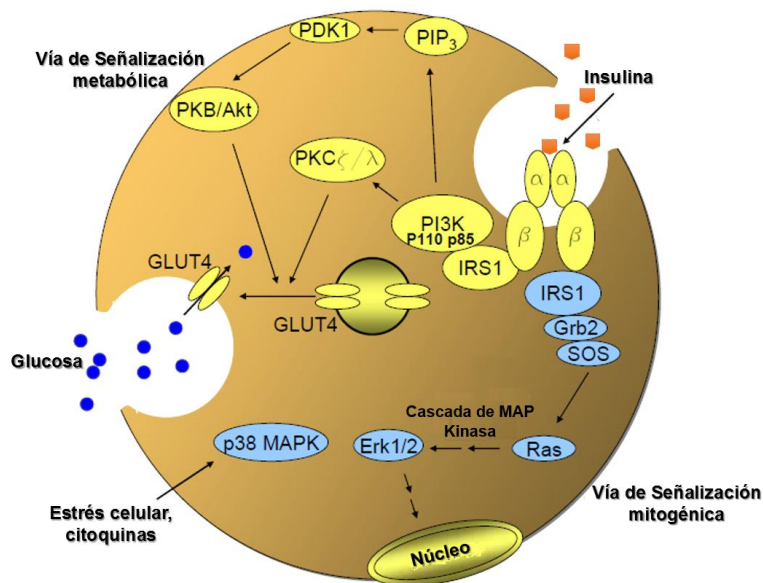


Figura 6. Esquema señalización de insulina en adipocitos. Fuente: Danielsson, Anna 2007 modificado

Akt es una proteína conocida como proteína quinasa B (PKB), es un intermediario para la señalización de insulina y factores de crecimiento, responde por estímulo de PI 3-Kinasa. Akt fosforila a la quinasa glucógeno sintasa 3 (GSK-3 *del inglés*, Glycogen Synthase Kinase-3) (Cross et al, 1995) y promueve la translocación de GLUT4 en adipocitos (Miura et al., 1997), para el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno en miocitos (Ueki et al., 1998).

Uno de los substratos de Akt identificados en adipocitos 3T3-L1, es AS160 (Akt Substrate of 160 kDa) (Kane et al., 2002). Esta proteína tiene un dominio que activa a las Rab GTPasa y fosforila a muchos residuos de Serina y Treonina en respuesta a la señalización de insulina. En adipocitos estimulados, AS160 tiene una distribución mayor en el citoplasma, en relación a adipocitos no estimulados. Se ha demostrado que es esencial para la translocación de las vesículas que contienen a transportadores GLUT4, activando la maquinaria exocítica (proteínas Rab) (Govers, 2014). Otra vía que regula la translocación de GLUT4 es por la PKC ζ/λ activado por la PI 3K (Figura 6).

3.6. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es una condición en la que la concentración de insulina en un organismo no es capaz de mantener el nivel normal de glucosa sanguínea. Los defectos de la habilidad para captar glucosa ocurren a nivel de los tejidos periféricos (tejido muscular, hepático y adiposo). Las células β secretan más insulina para compensar la anormal respuesta a la insulina, y a medida que pasa el tiempo se genera una progresiva pérdida de la funcionalidad de las células β , para liberar insulina en respuesta a la elevada concentración de glucosa, y se genera lo que es diabetes mellitus tipo 2 (Danielsson et al, 2005). La resistencia a la insulina en adipocitos resulta de una transducción de señal anormal del receptor de insulina a respuestas específicas y la inhibición de la lipólisis (Muoio & Newgard, 2008; Tan et al., 2015), además de estrés en el retículo endoplasmático, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, hipoxia y otros (Lee & Lee, 2014). Adicionalmente, la inflamación a nivel de tejido adiposo juega un importante rol en la resistencia a la insulina (Hotamisligil, 2000; Lee & Lee, 2014).

3.7. Especies en estudio

3.7.1. *Lupinus mutabilis* (tarwi).

Lupinus mutabilis (Lm), de nombre tradicional Tarwi, es una leguminosa, las semillas forman parte de la dieta de la población que vive en zonas altas de los Andes, encontrándose por casi toda Latinoamérica. Su importancia radica en la elevada cantidad de aceite contenidas en sus semillas, es por eso considerada como la soya de los andes (Gonzales et al., 2016). Las proteínas y aceites constituyen más de la mitad de su peso, con un 35.5% de proteínas, 16.9% de aceites, 7.65% de fibra cruda, 4.145% de cenizas y 35.77% de carbohidratos (Gonzales et al., 2016; Jacobsen et al., 2006). Contiene una gran cantidad de alcaloides quinolizidina y lupanina, lupanidina, 13-hidroxi-lupanina, 4-hidroxi-lupanina, esparteína y tetrahidro-roombifolina. Se ha descrito que alguno de estos componentes ejercen efectos anti-diabéticos (Fornasini et al., 2012)

Entre los usos medicinales tradicionales están: la diabetes, problemas renales, cansancio, etc. En un estudio clínico de fase I para analizar el efecto de *L. mutabilis*

sobre los niveles plasmáticos de insulina y glucosa se demostró que su consumo por sujetos sanos, jóvenes de peso normal, no altera significativamente los niveles sanguíneos de glucosa (Gonzales et al., 2016) e insulina (Fornasini et al., 2012). Por otro lado, la ingesta de dosis similares por individuos con hiperglicemia (glucosa en ayunas > 100 mg/dL) disminuyó significativamente los niveles de glucosa (Baldeón et al, 2012; Fornasini et al., 2012).

3.7.2. *Smallanthus sonchifolius* (Yacon).

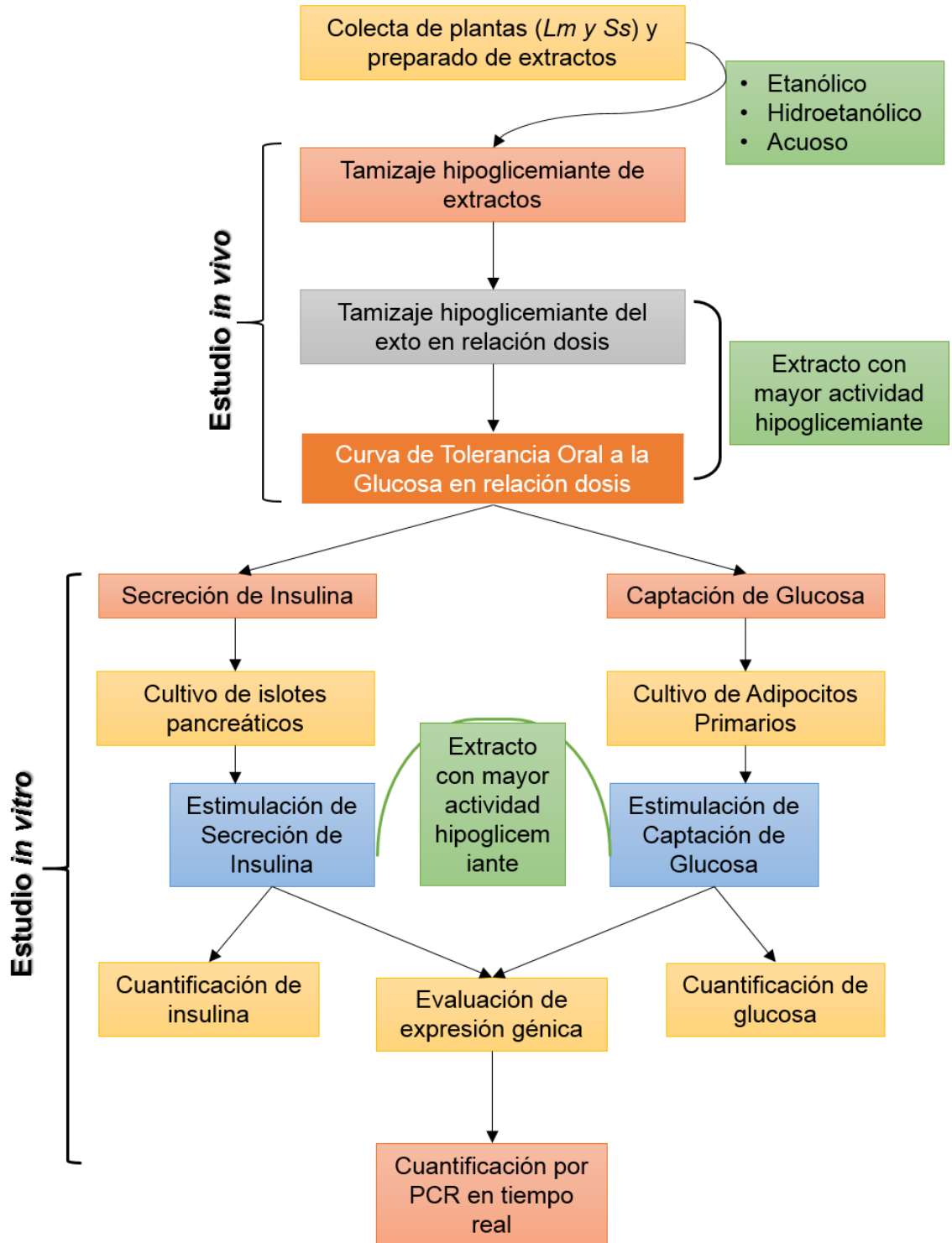
Smallanthus sonchifolius (Ss), de nombre tradicional Yacon, es un tubérculo de cultivo original de tierras altas en Sudamérica, constituye parte de la dieta de la población que viven en esos lugares, por lo general son consumidas como frutas o también secas. Se utiliza para calmar la sed en algunos lugares, gracias al contenido alto de agua que tiene la raíz fresca, para rejuvenecer la piel y aliviar problemas gastrointestinales, hepáticos y renales (Mayta et al., 2004)

Ss contiene abundante Fructooligosacaridos (FOS) y compuestos fenólicos antioxidantes (Adam et al, 2005), proteínas, carbohidratos y lípidos; entre los micronutriente (sodio, potasio, magnesio, calcio, fosforo, hierro, zinc y magnesio) y algunos metabolitos secundarios: sesquiterpeno lactonas (STLs), Flavonoides o compuestos fenólicos relacionados a ácidos clorogénicos (CGA) (De Oliveira et al., 2011; Simonovska et al, 2003), adicionalmente se identificaron otros compuestos incluyendo a diterpenos y fenilpropanoides (Qiu et al, 2008). Por otro lado, en análisis por HPLC se demostró la presencia de compuestos aromáticos, ácido cumarico, ácidos cafeícos, CGA, STL, flavonoides (Oliveira et al., 2011).

Entre las actividades biológicas descritas para los componentes mayoritarios de *S. sonchifolius* tenemos los siguientes: CGA se relaciona con propiedades anti-oxidantes, anti-inflamatorios (Peluso et al., 1995), anti-diabética (Aybar et al, 2001) y otras como la actividad prebiótica, anti-fúngica, pesticidas y actividades biológicas relacionados con contenidos de aceites esenciales (Campos et al, 2012). Los componentes fenólicos y flavonoides pueden modular la peroxidación de lípidos, involucrado en aterogénesis, trombosis y carcinogénesis a través de su actividad anti-oxidantes en contra de iones superóxido de O₂ (Valentová et al., 2008).

El extracto hidroetanólico de *S. sonchifolius* contiene compuestos fenólicos y CGA que ejercen efecto anti-diabético y anti-oxidante en ratas diabéticas inducidas por streptozotocina (STZ) (Genta et al., 2010); Extracto acuoso obtenido por decocción de las hojas de *S. sonchifolius* fue administrado por vía oral 8 ml/kg de peso en ratas diabéticas inducidas por STZ, durante 30 días, observando una disminución significativa del nivel de glucosa comparado con el grupo control y además se observó efecto hipoglicemiante a las 2 – 5h después de la administración por vía i.p. (Aybar et al., 2001). El tratamiento de ratas no diabéticas con extracto hidroetanólico reduce significativamente (28%) la glucosa sanguínea, teniendo mayor efecto en relación al extracto acuoso (Baroni et al , 2008).

4. DISEÑO METODOLOGICO



5. METODOLOGIA

5.1. Material Vegetal.

Las especies se colectaron de los productores locales. *Lm* (semillas) de la localidad de Ancoraimes, Provincia Omasuyos La Paz. (Latitud 15°55'19.3''Sur y longitud 68°53'50.1''Oeste) y *Ss* (tubérculo) de la localidad de Sorata, Provincia Larecaja (latitud 15°45'12.18''Sur y longitud 68°39'19.46'' Oeste). Un ejemplar de cada planta, *Lm* No. EG-1, *Fabaceae*) y *Ss* (No. EG-1, *Asteraceae*) fueron identificados y certificados por el Herbario Nacional de Bolivia de la Universidad Mayor de San Andrés y depositados en el área de farmacología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, UMSA, La Paz, Bolivia.

5.2. Preparación de extractos.

Tubérculos frescos de *Ss* fueron congelados y liofilizados para luego ser molidos, del mismo modo las semillas secas de *Lm* fueron molidas y ambos fueron macerados (50 g de *Ss*. y 200 g de *Lm*) en 1000 ml de H₂O destilada, extracto acuoso o *SsAq* y *LmAq*; en etanol al 70%, extracto hidroetanólico o *Ss70EtOH* y *Lm70EtOH* y en etanol absoluto, extracto etanólico o *SsEtOH* y *LmEtOH*, por 48 horas. Para maximizar el rendimiento del proceso de maceración se repitió dos (extracto acuoso) y cinco veces (extracto hidroetanólico y etanólico). El extracto acuoso obtenido fue filtrado y congelado para su posterior liofilización (Lyo Chamber Guard). Para los extractos hidroetanólico y etanólico, la eliminación de etanol se realizó mediante rotaevaporación (Heidolph), luego el extracto se congeló para su posterior liofilización (Lyo Chamber Guard).

5.3. Animales

Ratones Swiss albino machos de 20 ± 5 g fueron proporcionados por la Unidad de Ensayos Biológicos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de una semana, previo a los experimentos, mantenidos a 22°C en condiciones de ciclos de luz y oscuridad de 12 h y acceso libre a la comida y agua. El uso de animales de experimentación fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la propia Universidad.

5.4. Tamizaje Hipoglicemiante

Para evaluar el tipo de extracto con mayor efecto sobre el nivel de glucosa sanguínea, se realizó el tamizaje hipoglicemiante de los tres tipos de extractos (etanólico, hidroetanólico y acuoso) a una dosis de 2000mg/kg p.c. para *Lm* y 1000mg/kg p.c. para *Ss*. Los extractos acuosos e hidroetanólicos se resuspendieron en H₂O destilada; el extracto etanólico se resuspendió en una solución acuosa de Tween 80 al 1.5%. Se trabajó con 4 grupos de ratones en condiciones de libre acceso a comida y agua: Grupo 1 extracto etanólico (n=8), Grupo 2 extracto hidroetanólico (n=8), Grupo 3 extracto acuoso (n=8) y Grupo 4 placebo. Se administraron por vía oral 0.2 ml de los extractos y H₂O destilada o Tween 80 al 1.5% al grupo placebo del extracto hidroetanólico. La concentración de glucosa plasmática fue determinada con glucómetro (CLEVER-CHEK) a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas, en sangre obtenida por un corte de la punta de la cola. Posteriores evaluaciones de los extractos hidroetanólicos de ambas plantas a diferentes concentraciones fueron realizados por ser estos los de mayor actividad hipoglicemiante (Figura 7A y 8A).

5.5. Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa (CTOG)

El ensayo de la curva de tolerancia oral a la glucosa fue realizado con los extractos *Lm70EtOH* y *Ss70EtOH*. Se evaluaron las siguientes dosis: 2000 mg/kg p.c., 1000 mg/kg p.c., 500 mg/kg p.c. de *Lm70EtOH*, (n=10) para cada grupo y 1000 mg/kg p.c., 500 mg/kg p.c., 250 mg/kg p.c. de *Ss70EtOH* (n=10) para cada grupo. Los animales se dejaron en ayunas por 12 – 14 horas previo al ensayo, con libre acceso al agua. La sangre para la determinación de glucosa fue obtenida por un corte de la punta de la cola en diferentes tiempos: -60 min, al administrar el extracto; 0 min, al momento de la administración de la glucosa 2g/kg p.c; posteriormente a los 30, 60 y 120 min. El nivel de glucosa sanguínea se midió con un glucómetro (CLEVER CHECK). El volumen administrado de extracto y glucosa fue de 0.2 mL.

5.6. Aislamiento de islotes pancreáticos

Islotes pancreáticos fueron aislados de ratones (33 ± 2 g p.c.) siguiendo el método de digestión por Colagenasa (Hoa et al., 2007). Para esto el páncreas fue insuflado con solución de Colagenasa (0.9 mg/mL) a través del conducto biliar (Stull et al., 2012; Zmuda et al., 2011), una vez removido el páncreas se incubó a 37°C por 24 min para

su digestión. Luego se realizaron varios lavados con la solución de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) y se obtuvo los islotes pancreáticos mediante separación por gradiente de densidad Ficol-Hipaque 1077 y 1119 (Sigma Aldrich). Los islotes fueron colectados bajo un estereomicroscopio, para ser cultivados toda la noche a 37°C, con una atmosfera de 5% CO₂ y 95% de aire en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Aldrich) con 0.3 mg de L-glutamina y 11 mM de glucosa; suplementado con antibióticos (100 UI/mL penicilina y 0.1 mg/mL estreptomina) y Suero Fetal Bovino al 10%.

5.7. Evaluación de Secreción de insulina *in vitro*

Islotes pancreáticos fueron preincubados en aproximadamente 5 mL de buffer Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) (NaCl 118.4 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄*7H₂O 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 1.9 mM, NaHCO₃ 25 mM, HEPES 10 mM, 0.2% albumina sérica bovina) con 3.3 mM de Glucosa por 30 – 45 min a 37°C (Attie, 2015; Hoa et al., 2007; Norberg et al., 2004). Para la evaluación de la secreción de insulina se incubaron 3 islotes pancreáticos en 300 µL de KRB con 3.3 mM y 16.7 mM de glucosa más diferentes concentraciones de los extractos *Lm70EtOH* (20, 10 mg/mL) y *Ss70EtOH* (15.3 a 62.5 mg/mL), por 60 min a 37°C. Al finalizar la incubación se colectaron los 3 islotes de cada condición en RNA later para la extracción de material genético y 200 µL del sobrenadante se conservaron a -20°C para la cuantificación de insulina por ELISA.

5.8. Evaluación de secreción de insulina en presencia de inhibidores

Para investigar los posibles mecanismos por el que *Lm70EtOH* promueve la secreción de insulina en los islotes pancreáticos se incubaron con diferentes inhibidores: 0.25 mM de Diazoxide (Sigma-Aldrich) (Komatsu et al., 2002) para abrir los canales de K⁺; 50 mM de KCl, para la despolarización directa de las células β. Para investigar su efecto sobre los canales de Ca²⁺ en la secreción de insulina, los islotes fueron incubados con 10 µM de Nifedipine (Sigma-Aldrich), inhibidor de los canales de Ca²⁺. Para investigar el efecto del extracto sobre la PKC y PKA en la secreción de insulina, los islotes fueron incubados con o sin extracto y 10 µM de H89 (inhibidor de la PKA; Filipsson, 1998) (Sigma-Aldrich) o 1.5 µM de calphostin-C

(Inhibidor de la PKC; Thams & Capito, 2001) (Sigma-Aldrich) por 60 min en medio de buffer KRB con 3.3 mM y 16.7 mM Glucosa.

Para evaluar el posible efecto del extracto sobre la proteína G en la secreción de insulina. Los islotes pancreáticos fueron cultivados toda la noche a 37°C con o sin Pertussis toxina (Ptox) (100 ng/mL), en medio de cultivo RPMI 1640 con 11 mM de glucosa. Al siguiente día, los islotes tratados y no tratados con la Ptox fueron incubados con o sin extracto en medio de buffer KRB con 3.3 mM o 16.7 mM de glucosa (Hoa et al., 2007; Seino, 2005).

5.9. Cuantificación de insulina

La cuantificación de insulina se realizó mediante Mouse Insulin ELISA Kit (Thermo Scientific). Se incubo 100 µL del sobrenadante en cada pocillo por 2.5 h a temperatura ambiente, posterior a los lavados se incubo con 100 µL de Anticuerpo Biotinilado. Se realizó los lavados correspondientes, luego con 100 µL Streptavidin-HRP, posteriormente se adiciono 100 µL del substrato TMB, incubando en oscuridad. Finalmente se adiciono 50 µL de solución stop, para realizar las lecturas de absorbancia a 450 nm de longitud de onda y los datos fueron tabulados para su análisis.

5.10. Aislamiento de Adipocitos primarios murinos

Adipocitos primarios fueron aislados de ratones (30 ± 2 g de p.c.). El aislamiento se realizó mediante el método de digestión por colagenasa (Domingues et al, 2014), para esto se colecto tejido adiposo de epidídimo de ratón sobre buffer Krebs Ringer-Phosphate Hepes (KRPH) con pH 7.4. Inmediatamente se cortó en pedazos de 2 o 3 mm, se realizó varios lavados con el buffer KRPH, eliminando restos (células sanguíneas, y otro tipo de células), luego se adiciono 3 mL de solución de colagenasa (0.25 mg/mL) para la digestión por 2 h a 37°C con agitación suave. Cumplido el tiempo de digestión, se realizó varios lavados para eliminar restos de colagenasa y los restos de tejidos. Posteriormente los adipocitos se filtraron a través de una membrana de nylon para obtener solamente las células libres. La densidad celular de adipocitos fue cuantificado en un hemocitometro standard (Neubauer chamber).

5.11. Ensayo de Captación de glucosa

Los adipocitos primarios fueron cultivados por 30 – 40 min a 37°C en buffer Krebs Ringer-Phosphate Hepes (KRPH) libre de glucosa (NaCl 139 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄*7H₂O 1 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, CaCl₂ 2.2 mM, HEPES 20 mM, 1 % albumina sérica bovina, con pH 7.4). Se cultivaron en policubetas de 96 pocillos a una densidad celular de 3000 cel/pocillo/200 µL.

Para definir el tiempo óptimo de captación de glucosa, se incubo adipocitos con 10 mM de glucosa a una temperatura de 37°C con agitación moderada, posteriormente se colecto el intranadante cada 15 min desde 0 - 120 min, para la cuantificación de glucosa. La captación de glucosa se midió de manera indirecta, es decir la cantidad de glucosa restante en el medio de incubación después de un tiempo determinado; La cantidad disminuida representa la cantidad captada por los adipocitos. Para evaluar el efecto del extracto sobre la captación de glucosa, adipocitos primarios se pre-incubaron con o sin *Lm70EtOH* y *Ss70EtOH* a sus diferentes concentraciones (20, 10 y 5 mg/mL) por 20 min (Granados et al, 2015). Luego se adiciono 10 mM de glucosa a todos los pocillos (n=6). Todas las condiciones se incubaron por 30 min a 37°C con agitación moderada. Terminado el tiempo de incubación, se colecto 80-100 µL de los intranadantes, para la cuantificación de glucosa. Los Adipocitos fueron colectados para el aislamiento de material genético.

5.12. Cuantificación de D(+)Glucosa

La cuantificación de la concentración de D(+)Glucosa se realizó mediante el método enzimático colorimétrico Glucosa Oxidasa (Human) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubo 10 µL de intranadante con 1000 µL del reactivo de cuantificación por 10 min a 37°C, y se realizó las lecturas de las absorbancias a 505 nm de longitud de onda.

5.13. Extracción de RNA total

Para evaluar la expresión génica, se realizó la extracción de RNA total de los islotes pancreáticos y adipocitos primarios de ratones tratados en diferentes condiciones. Se procedió siguiendo las recomendaciones del fabricante (PureLink[®] RNA Mini Kit, Ambion). Las células se lisaron con 300 µL de Buffer de Lisis con 1% de 2-mercaptoetanol. Para la purificación de RNA se adiciono etanol absoluto con una

relación de volumen 1:1 para precipitar el material genético; el precipitado se transfirió en una columna (spin cartridge) y se realizaron los lavados con el Buffer de lavado (I y II). Para eluir el RNA retenido en la columna se adiciono e incubo con 50 μ L de H₂O libre de RNAsa, posterior a la incubación se eluyó mediante centrifugación en un tubo de recuperación y se almaceno a -80°C. La concentración y la pureza del RNA fueron determinadas con un cuantificador μ Drop Plate MultiSkan Go (Thermofisher).

5.14. Síntesis de cDNA (DNA complementario)

Se realizó la Reverso Transcripción (RT) a partir de una concentración <1 μ g de RNA total mediante el kit Taqman[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) con Random Hexamers primer. La composición del Master Mix de reacción fue 1.75 mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP, RNAsa inhibitor 1 U/ μ L, MultiScribe[™] RT 2.5 U/ μ L en un volumen final de 20 μ L. Las características del ciclado fueron los siguientes: 25°C por 10 min; 37°C por 30 min; 95°C por 5 min y 4°C para finalizar. Los cDNA fueron inmediatamente almacenados a -20°C.

5.15. Cuantificación de expresión génica.

Los niveles expresión génica se midieron por PCR en tiempo real, usando PowerUp[™] SYBR[™] Green Master Mix (Applied Biosystems). Los primers fueron seleccionados a partir de base de datos de RNA mensajero correspondiente a los genes: Insulina (*Ins*) y transportador de glucosa 2 (*Glut2*) para los islotes; transportador de glucosa 4 (*Glut4*) y receptor de insulina (*Insr*), para los adipocitos (Tabla 1). El volumen final reacción fue 20 μ L y cada reacción fue realizada por triplicado. Las amplificaciones siguieron el siguiente protocolo (50°C por 2 min y 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min). La expresión relativa fue determinada por el método de comparación de $\Delta\Delta C_t$, también conocido como el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001; Rao et al, 2013; Zhang et al, 2015). El nivel de expresión se normalizo con β -actina (housekeeping gene). Los resultados se presentan como n-veces respecto a los controles. Para el análisis estadístico de los experimentos de real time PCR, los resultados de las células tratadas se compararon con las no tratada (control negativo).

Tabla 1. Secuencia de primers para PCR en tiempo real.

mRNA	Tamaño	Secuencia	Código Genbank
housekeeping gene			
β actina	F	5'CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC 3'	NM_007393.3
	R	5' ATGGAGCCACCGATCCACA 3'	
Islotes			
Insulina	F	5' TGGCTTCTTCTACACACCCAAG 3'	NM_008386.3
	R	5' ACAATGCCACGCTTCTGCC 3'	
Glut2	F	5'TCAGAAGACAAGATCACCGGA 3'	NM_031197.2
	R	5'GCTGGTGTGACTGTAAGTGGG 3'	
Adipocitos			
Glut4	F	5'CTGTAACTTCATTGTCGGCATGG 3'	XM_006537146.2
	R	5' AGGCAGCTGAGATCTGGTCAAAC 3'	
Insr	F	5' CAGCTCGAAACTGCATGGTTG 3'	XM_006508701.1
	R	5' GGTGACATCCACCTCACAGGAA 3'	

5.16. Análisis de resultados.

El análisis estadístico se realizó empleando el software GraphPad Prism 6.0 (C.A). Los resultados se presentan como media \pm ES. Los datos de tamizaje hipoglicemiante y CTOG se analizaron mediante test múltiple de t-student con múltiples comparaciones Holm-Sidak method, con $\alpha=0.05$ Para los datos de secreción de insulina, captación de glucosa y expresión génica, las diferencias entre medias fueron analizadas por ANOVA de doble vía y múltiples comparaciones con el test de Bonferroni.

6. RESULTADOS

6.1. El extracto *Lm70EtOH* disminuye el nivel de glucosa plasmática en ratones

Se realizó el tamizaje hipoglicemiante de los extractos de *LmEtOH*, *Lm70EtOH* y *LmAq* a 2000 mg/kg p.c. en ratones normoglicémicos. El extracto *Lm70EtOH* disminuyó significativamente los niveles de glucosa plasmática después de 1 h de su administración en ratones. Los niveles de glucosa fueron: 1h (8.0 ± 0.4 mM *Lm70EtOH* vs. 10.1 ± 0.3 mM Placebo; $P < 0.01$), 2h (7.7 ± 0.6 mM *Lm70EtOH* vs. 10.4 ± 0.5 mM Placebo; $P < 0.01$), 4h (7.2 ± 0.8 mM *Lm70EtOH* vs. 9.9 ± 0.6 mM Placebo; $P < 0.001$) y 6 h (7.1 ± 0.4 mM *Lm70EtOH* vs. 9.5 ± 0.6 mM Placebo; $P < 0.01$) de evaluación (Figura 7A).

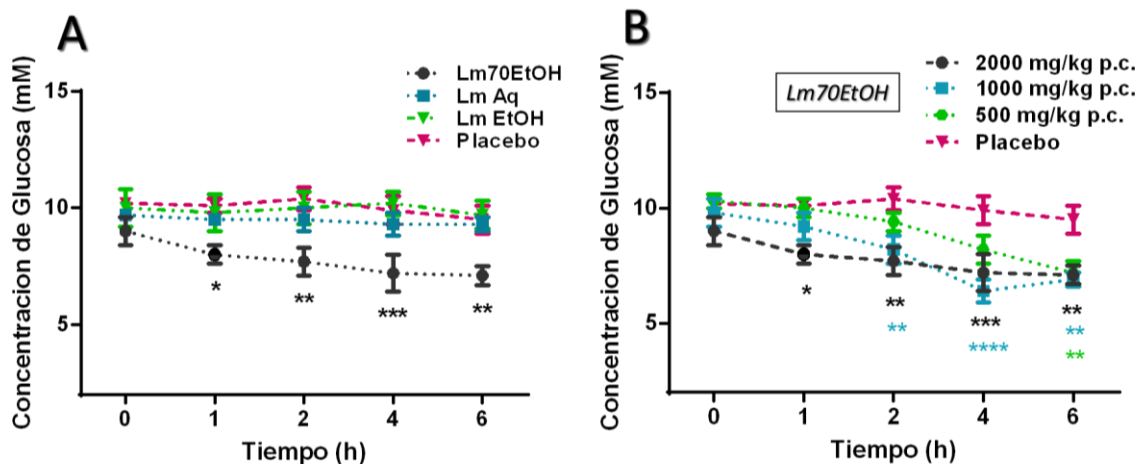


Figura 7. Tamizaje hipoglicemiante de extractos de *L. mutabilis*. Ratones Swiss albino fueron tratados **A.** Con extractos de *LmAq*, *Lm70EtOH* y *LmEtOH* (2000 mg/kg p.c). **B.** a dosis de 2000, 1000 y 500 mg/kg p.c del extracto *Lm70EtOH*. Se administró 0.2 ml de los extractos o placebo en simple dosis oral. La concentración de glucosa plasmática se midió a 0, 1, 2, 4 y 6 h. Los datos son presentados como la media \pm ES (n=8). * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$ comparado con el grupo placebo.

6.2. El efecto hipoglicemiante de *Lm70EtOH* es dosis-dependiente

La actividad hipoglicemiante de *Lm70EtOH* fue evaluada a diferentes dosis. La dosis de 2000 mg/kg p.c. disminuyó la glucosa plasmática a las 1 h después de la administración del extracto (10.1 ± 0.3 mM placebo vs. 8.0 ± 0.4 mM extracto) ($P < 0.01$), 2h (10.4 ± 0.5 mM placebo vs. 7.7 ± 0.6 mM extracto) ($P < 0.001$), 4h (9.9 ± 0.6 mM placebo vs. 7.2 ± 0.8 mM extracto) ($P < 0.0001$) y 6h (9.5 ± 0.6 mM placebo vs. 7.1 ± 0.4 mM extracto) ($P < 0.001$). A 1000 mg/kg p.c., los niveles de glucosa plasmática

disminuyeron a partir de 2h después de la administración del extracto (8.2 ± 0.6 mM extracto) ($P < 0.001$), 4h (6.4 ± 0.5 mM) ($P < 0.0001$) y 6h (6.9 ± 0.3 mM) ($P < 0.001$). A 500 mg/kg p.c a partir de las 6h (7.2 ± 0.5 mM) ($P < 0.001$). El efecto de *Lm70EtOH* disminuyó el nivel de glucosa dosis-dependiente (Figura 7B).

6.3. *Ss70EtOH* y *SsEtOH* presentan efecto hipoglicemiante en ratones

Se realizó el tamizaje hipoglicemiante de los extractos de *SsEtOH*, *Ss70EtOH* y *SsAq* a 1000 mg/kg p.c. en ratones normoglicémicos. Los extractos *Ss70EtOH* y *SsEtOH* disminuyeron el nivel de glucosa plasmática posterior a las 4h de administración del extracto *Ss70EtOH* (8.68 ± 0.38 mM) ($P < 0.001$) y *SsEtOH* (8.6 ± 0.58 mM) ($P < 0.01$) en comparación al grupo placebo 10.67 ± 0.46 mM (Figura 8A).

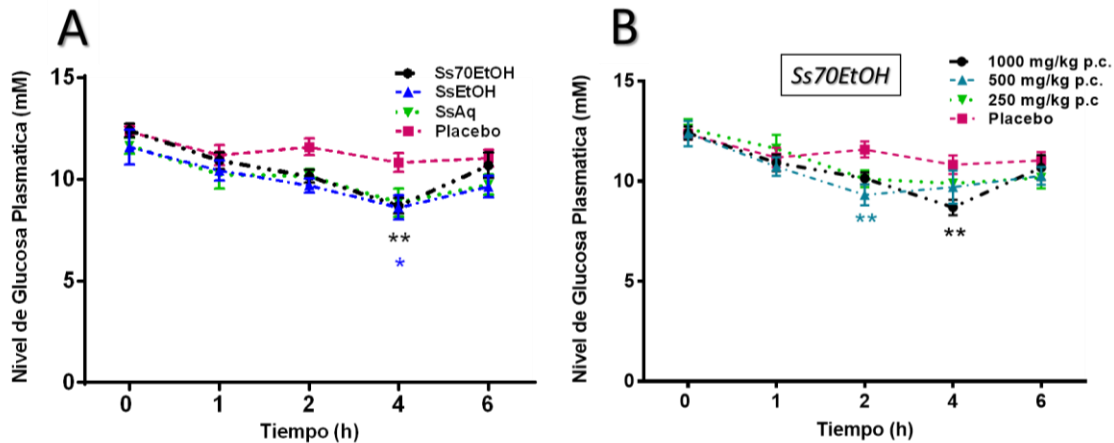


Figura 8. Tamizaje hipoglicemiante de extractos de *S. sonchifolius*. Ratones Swiss albino fueron tratados con **A.** 1000 mg/kg p.c de extractos *SsAq*, *Ss70EtOH* y *SsEtOH* **B.** a dosis de 1000, 500 y 250 mg/kg p.c del extracto *Ss70EtOH*. Se administró 0.2 ml de los extractos o grupo placebo en simple dosis oral. La concentración de glucosa plasmática se midió a 0, 1, 2, 4 y 6 h. Los datos son presentados como la media \pm ES (n=10). * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ comparado con el grupo placebo.

6.4. El efecto hipoglicemiante de *Ss70EtOH* no es dosis-dependiente

La actividad hipoglicemiante de *Ss70EtOH* fue evaluada a diferentes dosis. La dosis de 1000 mg/kg p.c. disminuyó la glucosa plasmática a las 4h después de la administración del extracto en relación al grupo control. El nivel de glucosa plasmática fue 8.68 ± 0.4 mM para *Ss70EtOH* versus el grupo placebo 10.76 ± 0.5 mM ($P < 0.001$) (Figura 8B). A 500 mg/kg p.c. la glucosa plasmática disminuyó a partir de las 2h posteriores a la administración del extracto en relación al grupo control (9.31 ± 0.5 mM y 11.82 ± 0.4 mM ($P < 0.001$), respectivamente) (Figura 8B).

6.5. *Lm70EtOH* y *Ss70EtOH* disminuyen el nivel de glucosa plasmática en la Curva de Tolerancia Oral a la Glucosa

Ratones en ayunas fueron tratados con *Lm70EtOH* a diferentes dosis de 2000, 1000 y 500 mg/kg p.c. La dosis de 2000 mg/kg p.c. disminuyó el nivel de glucosa plasmática a 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa (9.39 ± 0.3 mM ($p < 0.05$), 5.81 ± 0.3 mM ($p < 0.01$) y 4.62 ± 0.1 mM ($p < 0.05$) respectivamente, en comparación con el grupo placebo (Figura 9A). El Área Bajo la Curva comparado con el grupo placebo no fue estadísticamente significativo para las diferentes dosis (Figura 9B).

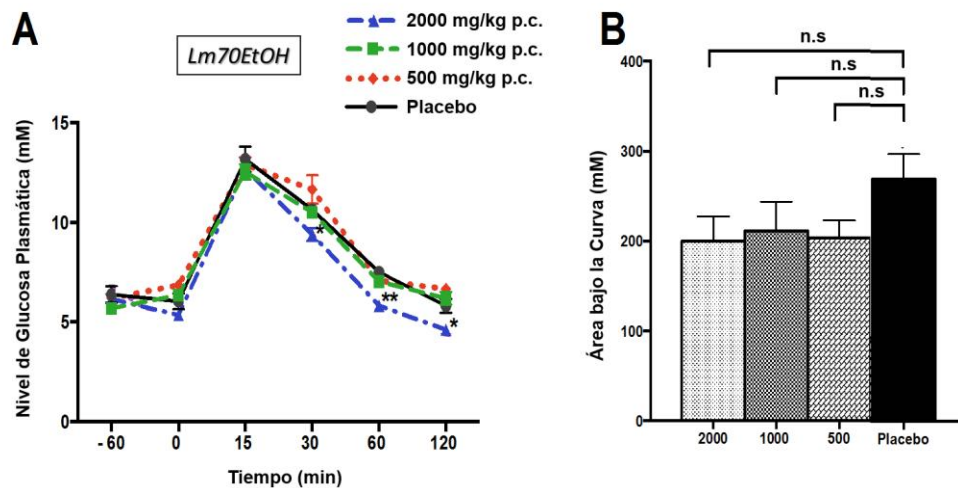


Figura 9. Curva de tolerancia Oral a la Glucosa A. con diferentes concentraciones dosis del extracto *Lm70EtOH*. Ratones machos Swiss albino en ayunas, fueron tratados con el extracto de *Lm70EtOH* a dosis de 2000, 1000 y 500 mg/kg p.c. Se midió los niveles de glucosa plasmática a los -60, 0, 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa 2 g/kg p.c.. **B. Área bajo la Curva de la CTOG.** Los datos son presentados en Media \pm ES (n=10). * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ comparados con el grupo placebo.

Ratones en ayunas fueron tratados con *Ss70EtOH* a las dosis de 1000, 500 y 250 mg/kg p.c. La dosis de 1000 mg/kg p.c. disminuyó los niveles de glucosa plasmática a los 30 y 60 min respecto al grupo placebo. A los 30 minutos el nivel de glucosa plasmática fue 15.4 ± 0.6 mM *Ss70EtOH* versus 17.4 ± 0.8 mM del grupo placebo ($P < 0.01$). A los 60 minutos el nivel de glucosa plasmática fue 12.03 ± 0.8 mM *Ss70EtOH* versus 14.9 ± 0.4 mM del grupo placebo ($P < 0.0001$) (Figura 10A).

Se calculó el área bajo la curva, para determinar el efecto global del extracto sobre la tolerancia a la glucosa tomando en cuenta el intervalo de tiempo 0 -120 min. Se compararon las medias de las diferentes dosis. El área bajo la curva para las dosis

de 1000 y 500 mg/kg p.c. fue estadísticamente significativo ($P < 0.001$) en comparación con el grupo placebo (375.9 ± 61.5 mM, 1000 mg/kg p.c; 329.7 ± 57.3 mM, 500 mg/kg p.c y 671.6 ± 46.6 mM, placebo) (Figura 10B).

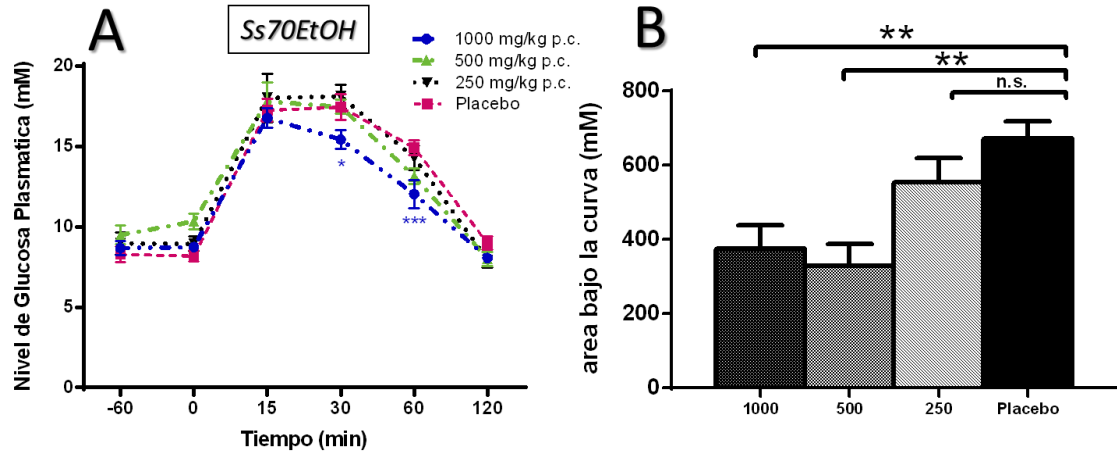


Figura 10. Curva de tolerancia Oral a la Glucosa. A. con diferentes concentraciones dosis de *Ss70EtOH*. R ratones machos Swiss albino en ayunas, fueron tratados con el extracto *Ss70EtOH* a dosis de 1000, 500 y 250 mg/kg p.c. se midió los niveles de glucosa plasmática a los -60, 0, 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa 2 g/kg p.c.. **B. Área bajo la Curva de la CTOG.** Los datos son presentados en Media \pm ES (n=10). * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ comparados con el grupo placebo.

6.6. *Lm70EtOH* promueve la secreción de insulina de manera concentración-dependiente

El extracto *Lm70EtOH* promueve la secreción de insulina en islotes pancreáticos murinos. En buffer KRB con 3.3 mM de glucosa, se incrementó la secreción de insulina de un nivel basal del control negativo (CN) de 316.7 ± 17 μ UI/mL/Isloite/h a 849.5 ± 0.3 μ UI/mL/Isloite/h con *Lm10* ($P < 0.01$) y 1182.4 ± 366.7 μ UI/mL/Isloite/h con *Lm20* ($P < 0.0001$). A 16.7 mM de glucosa, la secreción de insulina se incrementó de un basal de 526 ± 33.3 μ UI/mL/Isloite/h del control negativo a 1288.3 ± 185.7 μ UI/mL/Isloite/h con *Lm10* y 2380.1 ± 118.9 μ UI/mL/Isloite/h con *Lm20* ($P < 0.0001$) (Figura 11).

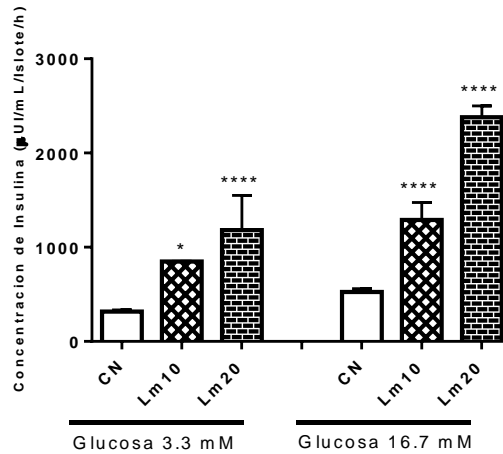


Figura 11. Efecto de extracto *Lm70EtOH* sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos. Islotes pancreáticos fueron incubados en buffer KRB con 3.3 mM y 16.7 mM de glucosa con o sin el extracto *Lm10* y *Lm20*. Los valores de insulina (µU/mL/Isote/h) se representan en Media ± ES (n=5). * $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ comparado con el CN.

6.7. *Ss70EtOH* no ejerce efecto sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos

Cuando los islotes pancreáticos fueron incubados con diferentes concentraciones de *Ss70EtOH*, no se observó efecto alguno sobre la secreción de insulina (Figura 12).

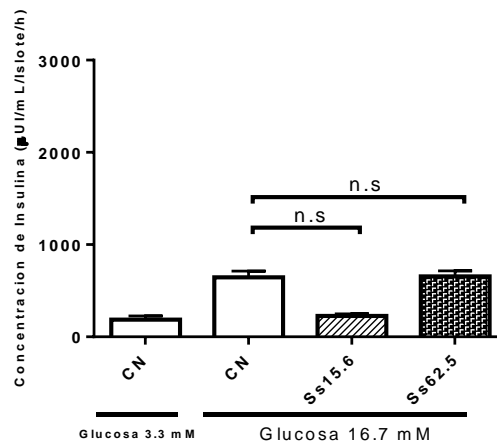


Figura 12. Efecto de extracto *Ss70EtOH* sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos. Islotes pancreáticos fueron incubados en buffer KRB 3.3 mM y 16.7 mM de glucosa con o sin el extracto *Ss70EtOH* 15.6 – 62.5 mg/mL. Los valores de insulina (µU/mL/Isote/h) se representan en Media ± ES (n=5). * $P < 0.01$ comparado con el CN.

6.8. La secreción de insulina por *Lm20* es reducida por efecto de los bloqueadores de canales de K^+ y Ca^{2+}

Para comprender el posible mecanismo por el que *Lm70EtOH* promueve la secreción de insulina, se incubaron islotes pancreáticos con Dx en buffer KRB 3.3 y 16.7 mM de glucosa. A 3.3 mM de glucosa, *Lm20* incremento de manera significativa la secreción de insulina ($1182.37 \pm 366.7 \mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$) en comparación a CN ($316.7 \pm 17 \mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$). Sin embargo, el tratamiento con *Lm20* en presencia de Dx redujo la secreción de insulina ($672.5 \pm 35.1 \mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$) de manera no significativa comparado al efecto de *Lm20*. En presencia de Dx+KCl, *Lm20* aumento, de manera no significativa, la secreción de insulina ($1577.9 \pm 0.1 \mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$) en comparación a islotes tratados con Dx+KCl ($859.2 \pm 53.8 \mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$) (Figura 13).

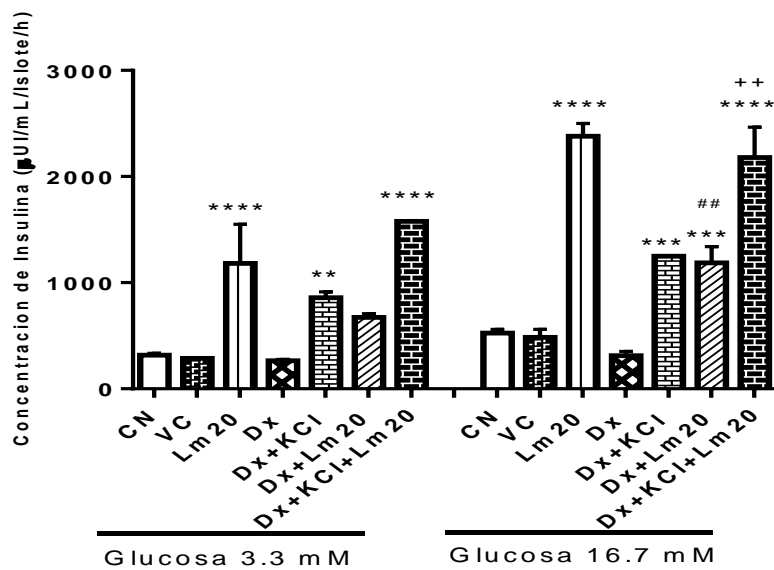


Figura 13. Efecto de *Lm20* en la secreción de insulina en presencia de Dx y KCl. Islotes pancreáticos fueron incubados en buffer KRB 3.3 mM y 16.7 mM de glucosa con o sin el extracto *Lm20* en presencia de 0.25 mM de Diazoxide y 50 mM de KCl. Los valores de insulina ($\mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$) se representan en Media \pm ES (n=3).vehículo control (VC). **P<0.01; ***P<0.001;****P<0.0001 comparado con CN. #P<0.01; ##P<0.001; ####P<0.0001 comparado con Lm20. **P<0.01 comparado con Dx+KCl.

A 16.7 mM de glucosa, el tratamiento con Dx disminuyó la secreción de insulina estimulada por *Lm20* de 2380.1 ± 11.89 a $1185.8 \pm 15.49 \mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$ (Dx+Lm20) (P<0.001). Sin embargo, *Lm20* incremento la secreción de insulina en presencia de

DX+KCl de 1250.1 ± 0.1 a 2178.7 ± 28.51 $\mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$ (Dx+KCl+Lm20) ($P < 0.001$) (Figura 13).

A 3.3 mM de glucosa, la secreción de insulina estimulada por *Lm20* fue disminuido, de manera no significativa por el tratamiento con Nif de 1182.3 ± 36.67 a 450.1 ± 31.3 $\mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$ (Lm+Nif). A 16.7 mM de glucosa, Nif disminuyó la secreción de insulina estimulada por *Lm20* de 2380.1 ± 11.89 a 1127.3 ± 12.06 $\mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$ (Lm+Nif) ($P < 0.01$) (Figura 14).

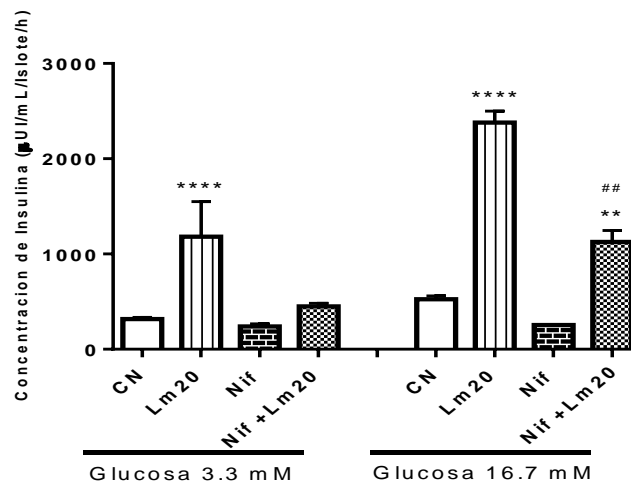


Figura 14. Efecto de *Lm20* en la secreción de insulina en presencia de Nifedipine (Nif). Islotes pancreáticos fueron incubados en KRB con 3.3 mM y 16.7 mM de glucosa con o sin *Lm20* en presencia de 10 μM Nif. Los valores de insulina ($\mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$) se representan en Media \pm ES ($n=3$). ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ comparado con CN. ## $P < 0.001$; comparado con *Lm20*.

6.9. La secreción de insulina por *Lm20* involucra la actividad de PKA y PKC.

A 3.3 mM de glucosa, H89 y Calphostin-C disminuyeron de manera no significativa, la secreción de insulina por *Lm20* de 1182.4 ± 36.67 a 428.5 ± 0.2 (H89+*Lm20*) y 596.8 ± 0.1 $\mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$ (Cal-C+*Lm20*). A 16.7 mM de glucosa, la secreción de insulina por *Lm20* fue disminuido de 2380.1 ± 11.89 (*Lm20*) a 644.4 ± 62.2 ($P < 0.0001$) H89+*Lm20* y 1029.7 ± 21.28 $\mu\text{UI}/\text{mL}/\text{Islote}/\text{h}$ ($P < 0.001$) Cal-C+*Lm20* (Figura 15).

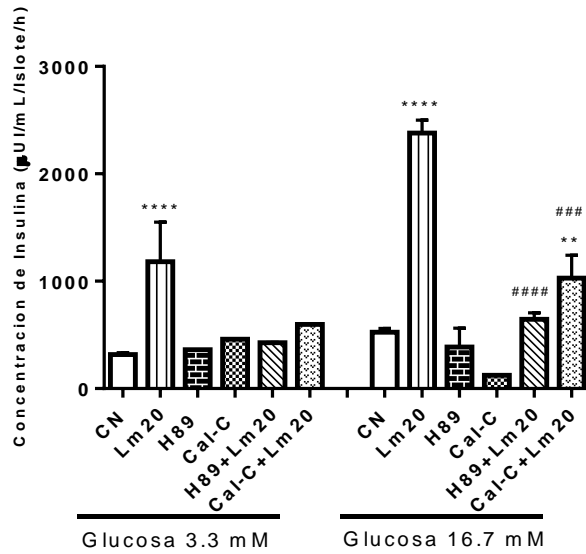


Figura 15. Efecto de *Lm20* en la secreción de insulina en islotes incubados con inhibidores de PKA y PKC. Islotes pancreáticos fueron incubados en KRB 3.3 mM y 16.7 mM de glucosa con o sin *Lm20* en presencia de 10 µM de H89 y 1.5 µM de Cal-C, inhibidores de la PKA y PKC respectivamente. Los valores se insulina (µUI/mL/Islole/h) se representan en Media ± ES (n=3). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ comparado con CN. # $P < 0.01$; ## $P < 0.001$; ### $P < 0.0001$ comparado con solo *Lm20*.

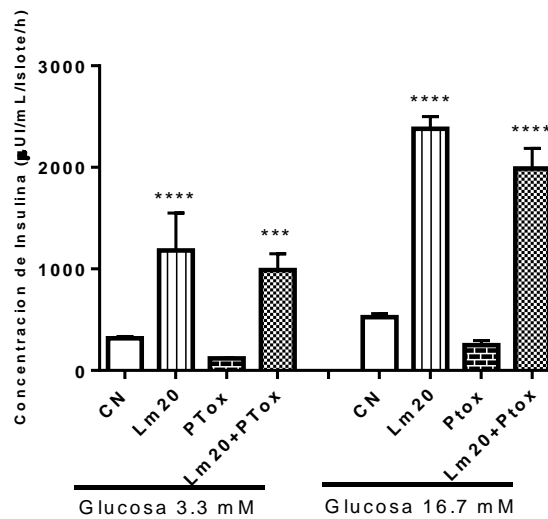


Figura 16. Efecto del extracto *Lm70EtOH* en la secreción de insulina en presencia de Ptox. Islotes pancreáticos fueron incubados en KRB 3.3 mM y 16.7 mM con o sin *Lm20* en presencia de 100 ng/mL de Ptox. Los valores se insulina (µUI/mL/Islole/h) se representan en Media ± ES (n=3). ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ comparado con CN.

En los islotes tratados con 100 ng/mL de Ptox la secreción de insulina por *Lm20* fue disminuido, de manera no significativa de 1182.4 ± 36.67 µUI/mL/Islole/h *Lm20* a

$988.8 \pm 160.5 \mu\text{UI/mL/Isote/h}$ (Ptox+Lm20) y ($2380.1 \pm 118.9 \mu\text{UI/mL/Isote/h}$ Lm20 a $1988.4 \pm 19.75 \mu\text{UI/mL/Isote/h}$ Ptox+Lm20) con 3.3 mM y 16.7 mM de glucosa respectivamente, en ambos casos no fue estadísticamente significativo (Figura 16).

6.10. La captación de glucosa por los adipocitos primarios fue significativa entre 30 – 60 min de incubación

La glucosa fue captada en mayor proporción por los adipocitos hasta los 60 min después de la incubación. Los adipocitos fueron incubados en buffer KRPH 10 mM de glucosa entre 0 -120 min, colectando el intranadante cada 15 min. La concentración de glucosa con 1500 cel/pocillo son los siguientes: 0 min con 9.97 ± 0.1 mM; 30 min con 9.19 ± 0.1 mM; 45 min con 7.98 ± 0.3 mM; 60 min con 6.85 ± 0.1 mM de glucosa (Figura 17A). La concentración de glucosa para los diferentes tiempos con 3000 cel/pocillo son los siguientes: 0 min con 10.1 ± 0.1 mM; 30 min con 8.6 ± 0.2 mM; 45 min con 7.2 ± 0.2 mM; 60 min con 6.6 ± 0.1 mM de glucosa. (Figura 17B).

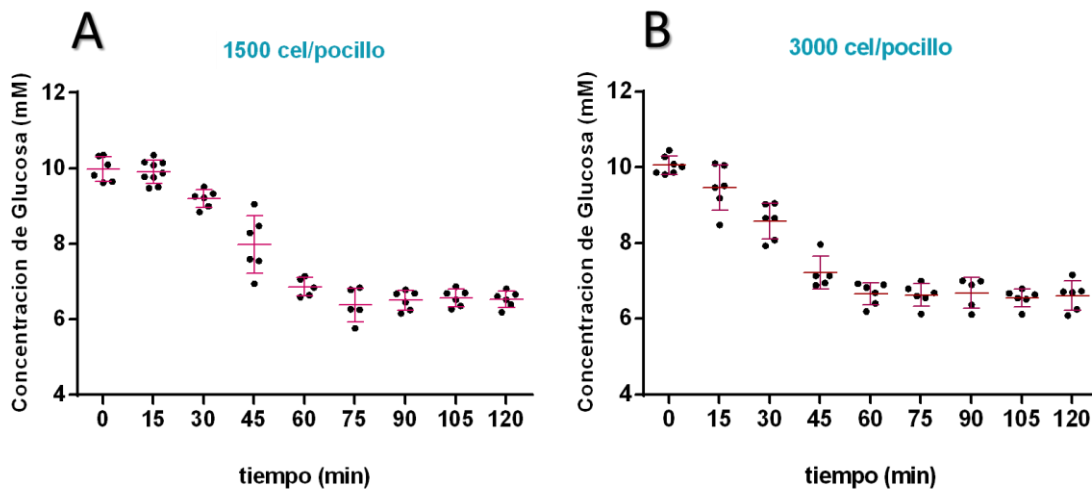


Figura 17. Tamizaje de captación de glucosa en adipocitos primarios. Se incubaron adipocitos **A.** 1500 cel/pocillo. **B.** 3000 cel/pocillo, en buffer KRPH con 10 mM de D(+)-glucosa. Se colectó el intranadante cada 15 min de 0 - 120 min, para medir la cantidad de glucosa restante.

6.11. Lm70EtOH promueve la captación de glucosa en adipocitos primarios

Lm estimuló significativamente el consumo de glucosa del medio de incubación por adipocitos primarios, indicando que promueve la captación de glucosa. La concentración de glucosa disminuyó de 8.88 ± 0.3 mM control negativo a 7.57 ± 0.2

mM con *Lm10* ($P < 0.001$) y con *Lm20* y *Lm5* (7.97 ± 0.2 mM y 7.98 ± 0.2 mM respectivamente) ($P < 0.05$) (Figura 18A).

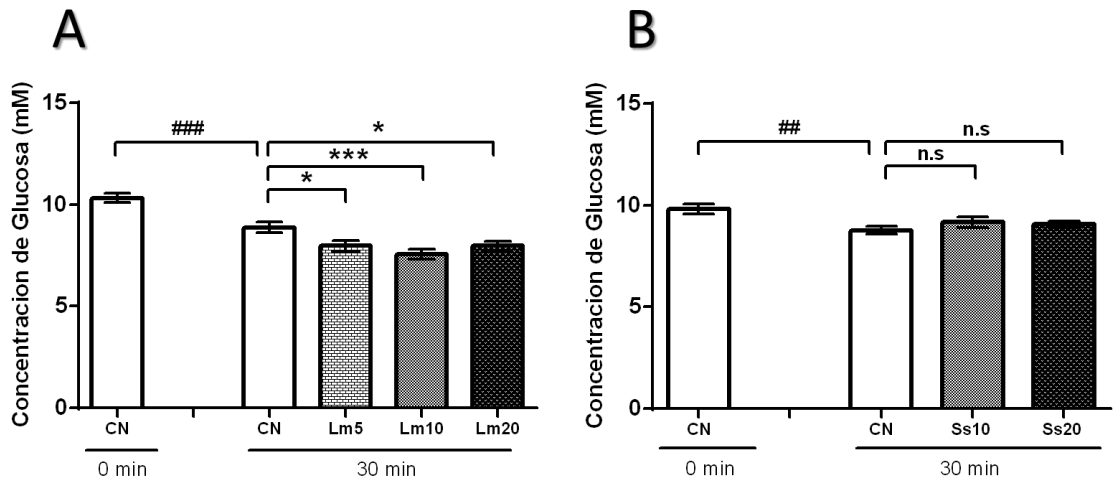


Figura 18. Efecto de los extractos sobre la captación de glucosa en adipocitos. Se incubaron 3000 cel/pocillo ($n=6$) en buffer KRPH 10 mM de glucosa con o sin el extracto por 30 min. **(A)** *Lm70EtOH* (*Lm5*, *Lm10* y *Lm20*) y **(B)** *Ss70EtOH* (*Ss10* y *Ss20*). Se colectó el intranadante a 0 y 30 min después de la incubación con glucosa, para medir la cantidad de glucosa restante en el medio de incubación. Los valores de glucosa (mM) se representan en Media \pm ES ($n=24$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$ comparado con CN (30 min). ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ comparado con CN (0 min).

6.12. *Ss70EtOH* no promueve la captación de glucosa en adipocitos primarios

El extracto *Ss70EtOH* no incrementa la captación de glucosa en comparación con el grupo control. Ambas concentraciones evaluadas no promovieron la disminución de glucosa por los adipocitos (Figura 18B).

6.13. *Lm70EtOH* modula la expresión de *Ins* y *Glut2* en islotes pancreáticos murinos

El nivel de expresión génica de *Ins* y *Glut2* fue mayor en islotes pancreáticos tratados con *Lm70EtOH*. Islotes pancreáticos fueron colectados después de la estimulación de la secreción de insulina para obtener mRNA total. Se determinó el nivel de expresión génica por PCR en tiempo real normalizado con β -actina (*housekeeping gene*). La expresión génica de *Ins* se incrementó 1.89 veces con *Lm10* ($P < 0.01$) y 3.2

veces con *Lm20* ($P < 0.00001$). La expresión génica de *Glut2* se incrementó 2.5 veces con *Lm10* ($P < 0.01$) y 2.7 veces *Lm20* ($P < 0.001$) (Figura 19).

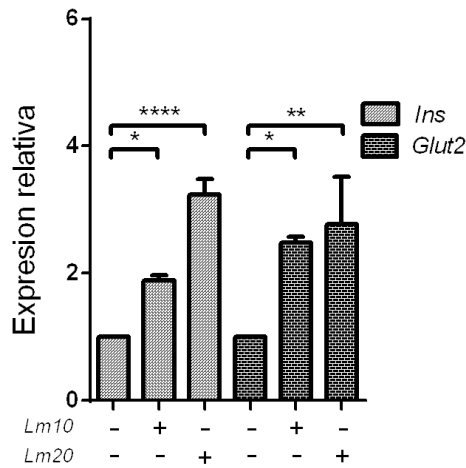


Figura 19. Efecto de *Lm70EtOH* sobre la expresión génica de *Ins* y *Glut2* en islotes pancreáticos. Islotes pancreáticos murinos fueron incubados con o sin *Lm70EtOH* (10 y 20 mg/mL) durante 30 min. Se determinó el nivel de expresión génica por PCR en tiempo real, normalizando los valores con β -actina (*housekeeping gene*). Los valores se representan en n-veces media \pm ES (n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$ comparado con CN. ## $P < 0.001$, ### $P < 0.0001$ comparado con *Lm20*.

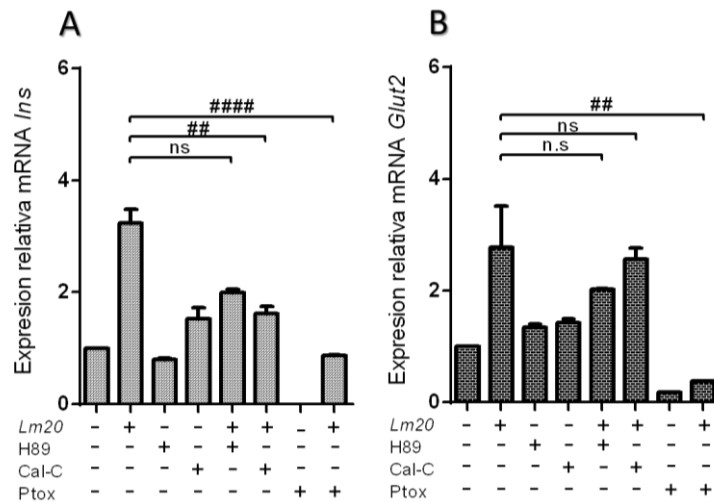


Figura 20. Efecto de *Lm20* sobre la expresión génica en islotes pancreáticos con inhibidores. Islotes pancreáticos murinos fueron incubados con o sin *Lm20* e inhibidores durante 30 min. Se determinó el nivel de expresión génica por PCR en tiempo real, normalizando los valores con β -actina (*housekeeping gene*). **A.** Expresión de *Ins*. **B.** Expresión de *Glut2*. Los valores representan en n-veces media \pm ES (n=3). ## $P < 0.001$, ### $P < 0.0001$ comparado con *Lm20*.

La expresión génica de *Ins* y *Glut2* estimulados por *Lm20* al ser tratados con inhibidores específicos de la actividad de la quinasas PKA y PKC y de la proteína G, disminuyeron su expresión en islotes pancreáticos. Por ejemplo, en presencia de

Cal-C la expresión de *Ins* por *Lm20* fue disminuido significativamente hasta 1.6 veces ($P < 0.01$) (Figura 20B). Por otro lado, en islotes tratados con Ptox, la expresión génica de *Ins* y *Glut2* disminuyeron 2.34 veces ($P < 0.0001$) y 2.4 veces ($P < 0.001$) respectivamente, en células tratadas con *Lm20* (Figura 20A y B).

6.14. *Lm20* modula le expresión de *Insr* y *Glut4* en adipocitos primarios

Adipocitos primarios fueron tratados con o sin *Lm20* de 0-120 min, colectando las células cada 30 min para obtener mRNA total de cada condición. Se determinó la expresión relativa por PCR en tiempo real de *Insr* y *Glut4* normalizando con β -actina (*housekeeping gene*). Las comparaciones se realizaron con 0 min en las diferentes condiciones. En el control negativo, la expresión de *Insr* a los 30 min fue 2 veces más ($P < 0.01$) y *Glut4* 1.6 veces más ($P < 0.001$) comparado con 0 min (Figura 21A y B respectivamente). El tratamiento con *Lm20* incremento la expresión de *Insr* a los 30 min (2.6 veces) y 60 min (12 veces) ($P < 0.0001$) comparados con 0 min (Figura 21A). *Glut4* se expresó en adipocitos incubados con *Lm20* a los 30 min (2.3 veces), 60 min (8.2 veces) y 120 min (2.8 veces) comparados con 0 min ($P < 0.0001$) (Figura 21B).

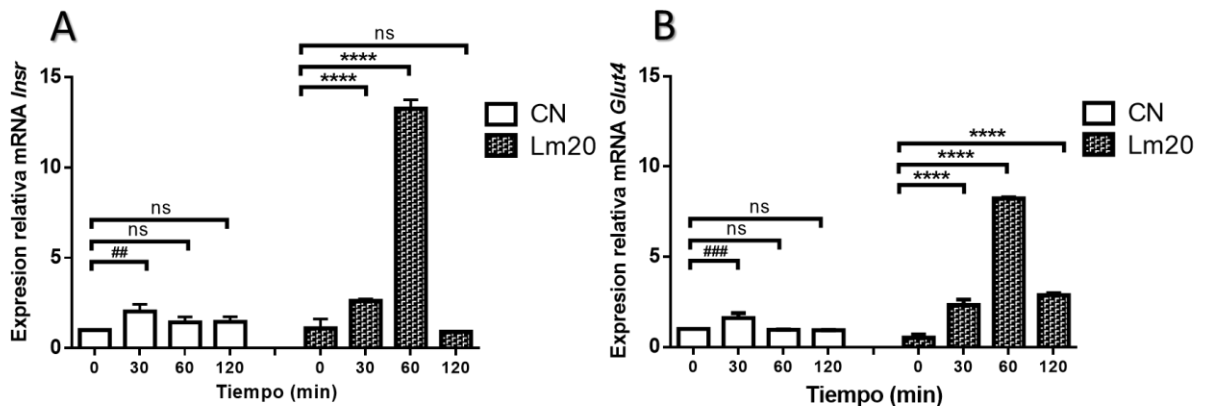


Figura 21. Efecto de *Lm20* en la expresión génica de (A) *Insr* y (B) *Glut4* en adipocitos primarios Adipocitos primarios fueron tratados con o sin *Lm20* desde 0-120 min cada 30 min. Se determinó el nivel de expresión génica por PCR en tiempo real, normalizando los valores con β -actina (*housekeeping gene*). Los valores representan en n-veces media \pm ES. ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ comparado con 0 min control negativo. **** $P < 0.0001$ comparado con 0 min de *Lm20*.

7. DISCUSION

En los últimos años la información etnobotánica a nivel mundial indica una cantidad importante de plantas usadas para el control de la diabetes mellitus, y pocos de ellos se han estudiado hasta ahora (Singh et al., 2013). Los resultados de nuestra investigación muestran que *L. mutabilis* (Tarwi) y *S. sonchifolius* (Yacon) disminuyen significativamente los niveles de glucosa plasmática en ratones, efecto observado tras la administración por vía oral del extracto hidroetanólico de ambas plantas a ratones normoglicémicos y ratones hiperglicémicos inducidos en la CTOG. Sin embargo, solo *Lm70EtOH* promovió la secreción de insulina en islotes pancreáticos y captación en glucosa en adipocitos primarios, no así *Ss70EtOH*. Además, genes como *Ins* y *Glut2* en islotes pancreáticos; *Insr* y *Glut4* en adipocitos primarios se expresaron más, estimulados por *Lm70EtOH*.

S. sonchifolius es una planta andina utilizada para consumo diario por la población local y además para el control de la diabetes, desordenes digestivos y renales (Honoré et al., 2012; Ojansivu et al., 2011). Esta planta crece aproximadamente entre 1.5 – 3 m de altura y con 4 – 20 raíces (tubérculo) (Delgado et al., 2013; Svobodová et al., 2013). Existen varios estudios con las hojas de *S. sonchifolius* donde se demuestra su actividad hipoglicémica en ratones (Miura et al, 2004; Miura et al., 1997) y ratas (Aybar et al., 2001; Baroni et al., 2008; Genta et al., 2010; Habib et al, 2011). En el presente trabajo se estudió la actividad hipoglicémica de la raíz de *S. sonchifolius*, porque la raíz (tubérculo) es consumido a diario mediante cocción y queremos rescatar su uso tradicional. Con nuestras investigaciones demostramos la actividad hipoglicémica del tubérculo de *S. sonchifolius* en ratones normoglicémicos y ratones hiperglicémicos inducidos, donde el extracto disminuyó el nivel de glucosa plasmática.

La actividad hipoglicémica de *S. sonchifolius* (tubérculo) tendría relación con compuestos compartidos de extractos de hojas de *S. sonchifolius* (Lachman et al, 2003), los cuales muestran actividad hipoglicémica y antioxidante (Genta et al., 2010; Miura et al., 2004; Valentová et al., 2004). Sin embargo, la actividad hipoglicémica del extracto hidroetanólico de *S. sonchifolius* no estaría relacionada con la secreción de insulina en islotes pancreáticos o el incremento de la captación

de glucosa en adipocitos primarios, en ambos modelos no se observaron diferencias significativas. El mecanismo por el que *S. sonchifolius* actúa estaría relacionado con otro proceso del metabolismo de la glucosa, como ser la absorción de glucosa intestinal o la disminución de producción de glucosa a nivel hepático a través de la gluconeogénesis y glucogenólisis; esto se puede sustentar por la presencia de componentes en el extracto; uno de ellos es el ácido clorogénico, el más abundantes de los compuestos polifenólicos (Takenaka et al, 2003). Varios estudios muestran su efecto sobre la disminución de glucosa sanguínea postprandial atribuido al aumento de la sensibilidad a la insulina (Meng et al, 2013), también a nivel hepático inhibiendo en un 40% la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa (Bassoli et al., 2008), enzima hepática que promueve la liberación de glucosa a través de los procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis (Arion et al., 1997; Vitrac et al, 2010).

La cantidad de glucosa absorbida a nivel intestinal juega un rol importante en el nivel de glucosa plasmática y la diabetes (Hanhineva et al., 2010). *S. sonchifolius* se caracteriza por su alto contenido de carbohidratos no digeribles, representados por los oligofructanos o fructooligosacáridos con uniones $\beta(2\rightarrow1)$ (Mayta et al., 2004); estos azúcares son difíciles de ser degradados por enzimas gástricas, permitiendo tener bajo contenido calórico (Genta et al, 2005) y disminuir los niveles de glucosa plasmática (Genta et al., 2009).

La actividad hipoglicémica de *L. mutabilis* se debe al incremento de la secreción de insulina en islotes pancreáticos y la captación de glucosa en adipocitos primarios. Existen muchas investigaciones de *L. mutabilis* debido a su alto valor nutritivo y sus propiedades hipoglicémica y antioxidantes (Baldeón et al., 2012; Fornasini et al., 2012; Jacobsen et al, 2006). El efecto ejercido por *Lm70EtOH* podría deberse a la presencia de algunos componentes comunes en especies de *Lupinus* de los cuales se tiene estudios reportados (Gurrola-díaz et al., 2008; Ruiz & Sotelo, 2001; Wink et al., 1995), entre ellos algunos alcaloides como esparteína, 2.17-dioxosparteína, 17-tionosparteína, multiflorina, o 17-hidroxi-lupanina incrementan la secreción de insulina en islotes pancreáticos normales de rata (Gurrola-díaz et al., 2008; Kroc et al., 2016; Paolisso et al., 1985); y otras como: esparteína, lupanina, 13-hidro-xilupanina y 18-oxo-lupanina incrementan la secreción de insulina en islotes

pancreáticos de ratones normales y ratones diabéticos inducidos con streptozotocina (García et al., 2004; Gurrola-díaz et al., 2008; Wiedemann et al., 2015).

En nuestros experimentos observamos que *Lm70EtOH* promueve la secreción de insulina concentración-dependiente en islotes pancreáticos murinos dependiente de la actividad de PKA y PKC, además de los canales de K^+ dependientes de ATP. Para estudiar el posible mecanismo primero consideramos la vía dependiente de los canales de K^+ estimulado por la glucosa. Donde, el incremento de la glucosa, provoca un elevado metabolismo de glucosa en las células β y se eleva el ATP. Se cierran casi todos los canales de K^+ dependientes de ATP en las células β (Carroll et al., 1988; Cook et al., 1984), lo que provoca la despolarización de las células β , y a consecuencia de eso se permite el ingreso de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, permitiendo la secreción de insulina por las células β (Thams et al., 2005). Pero cuando las células se exponen a Dx (inhibidor de canales de K^+), la secreción de insulina disminuye (Henquin & Meissner, 1982; Trube et al., 1986) debido a la apertura de los canales de K^+ y alteración del flujo de K^+ (D'hahan et al., 1999). En nuestras evaluaciones la secreción de insulina por *Lm70EtOH* fue disminuida significativamente por Dx, lo que significa que podía actuar dependiente de los canales de K^+ . No se conoce específicamente que componentes podrían ejercer ese efecto, pero existe un estudio donde lupanina promueve la secreción de insulina influenciado por los canales de K^+ dependientes a ATP (Wiedemann et al., 2015).

Otra vía importante son los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente, (Pillai & Joseph, 2010) se abren en respuesta a la despolarización provocada por el cierre de los canales de K^+ , para el ingreso de Ca^{2+} a la células β . Utilizando Nif, un bloqueador de los canales de Ca^{2+} que disminuye la secreción de insulina debido a la poca disponibilidad de Ca^{2+} intracelular a causa del bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a la célula β (Henquin, 2000; Straub & Sharp, 2002). En nuestras evaluaciones la secreción de insulina por *Lm70EtOH* fue de disminuida por Nif, indicando que la estimulación de secreción de insulina por *Lm70EtOH* involucra a los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente.

La secreción de insulina por *Lm70EtOH* fue disminuida por la presencia de inhibidores de PKA y PKC, lo que significa que los componentes de *Lm70EtOH* actuarían principalmente dependientes de las PKA y PKC. La señalización por segundos mensajeros, principalmente de cAMP y DAG incrementan la secreción de insulina a través de la activación de eventos de la fosforilación de proteínas mediados por PKA y PKC respectivamente (Biden et al., 2010; Kang et al., 2006; Seino, 2005). Estas quinasas activan proteínas de la maquinaria exocítica (Chen et al., 2005; Neshher et al., 2002; Rorsman & Renström, 2003; Seino, 2005; Wan et al., 2004) y también factores de transcripción involucrados en la expresión de *Ins* y *Glut2* (Biden et al., 2010; Jeon et al., 2015).

Cuando los islotes se incubaron con Ptox la secreción de insulina por *Lm70EtOH* no fue reducida, lo que significa que el extracto actuaría de manera independiente a la señalización por proteína G. Las proteínas G_e y G_i principalmente han sido funcionalmente ligados a la exocitosis de la insulina (Hoa et al., 2004; Hoa et al., 2007). Ptox inhibe reversiblemente la secreción de insulina dependiente de proteína G_i y G_e vía ADP-ribosilación (Komatsu et al., 2002).

Por lo tanto, la secreción de insulina por *Lm70EtOH* estaría relacionada con la actividad de las PKA y PKC, y algunos componentes también actuarían dependiente de los canales de K^+ y Ca^{2+} .

Además *Lm70EtOH* promueve la expresión de *Ins* y *Glut2* en islotes pancreáticos concentración-dependiente. El elevado nivel transcripción de *Ins* podría contribuir a una mejor respuesta en la secreción de insulina y activa la maquinaria exocítica potenciando así su efecto. Cuando se inhibe la actividad de PKC a través de su inhibidor específico, la expresión de *Ins* y *Glut2* por *Lm70EtOH* se ve disminuida. Estas quinasas median la activación de factores de transcripción necesarios para la expresión de estos genes, por ejemplo PKC activa a pdx-1 (Biden et al., 2010). Pdx-1 es un factor de transcripción necesario para la expresión de *Ins* y *Glut2* (Andrali et al., 2008; Poitout et al., 2006). La señalización de la proteína G sería importante en la expresión de *Ins* y *Glut2* mediado por *Lm70EtOH*, debido a que cuando se inhibió la actividad de la proteína G, la expresión génica fue reducida. Algunos estudios muestran que componentes como la lupanina, promueven la expresión de *Ins* en

islotes (Wiedemann et al., 2015), γ -Conglutina promueve la expresión de *Ins-1* a través de la inhibición de la vía c-Jun N-terminal protein kinase (JNK), la inhibición de esta vía contribuye a la mayor expresión del gen de la insulina (Kaneto et al., 2002).

El extracto crudo de *Lm70EtOH* contiene múltiples componentes, que podrían estar involucrados específicamente en activar componentes de la secreción de insulina y otras en promover la expresión de genes relacionados con la homeostasis de la glucosa por la activación de factores de transcripción y otros mediadores. Se necesita realizar estudios posteriores para llegar a entender con más detalles utilizando compuestos aislados del extracto *Lm70EtOH*, principalmente para ver el efecto específico en la secreción de insulina y la expresión génica.

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que *Lm70EtOH* promueve la captación de glucosa en tejidos periféricos. Se midió la captación de glucosa por adipocitos, donde la cantidad de glucosa disminuida es equivalente a la cantidad captada por las células. En adipocitos, el metabolismo de la glucosa va direccionado a la adipogénesis (Wilcox, 2005; Wu et al., 2013); en hígado y musculo hacia la glucógenogenesis (Ueki et al., 1998). Se conoce que en aislados acuosos de especies de *Lupinus* existe elevada cantidad de una proteína llamado γ -conglutina. La administración de esta proteína en ratas produce una disminución significativa de la glucosa con relación al placebo (Baldeón et al., 2012; Linnemann et al, 2016; Lovati et al., 2017). Estudios *in vitro* en células HepG2 demostraron mayor consumo de glucosa por efecto de la γ -conglutina y en mioblastos C2C12 actuó mimetizando la acción de la insulina a través de su receptor, activando la vía dependiente de PI 3K, para promover la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática (Lovati et al., 2017; Terruzzi et al., 2011). En nuestro caso podemos inferir que la actividad pueda deberse a ese péptido por efecto similar, pero no conocemos exactamente la composición de *Lm70EtOH*. Además *Lm70EtOH* promueve la expresión de *Glut4* y *Insr* en adipocitos, la expresión de estos genes están mediados por la señalización de la insulina y activa la transcripción (Gross et al, 2004; Muller et al, 2006), por lo tanto inferimos que el aumento de expresión de estos genes podría estar

relacionado por el efecto mimético de γ -conglutina a la acción de la insulina (Terruzzi et al., 2011).

Finalmente, debido al efecto de *Lm70EtOH* sobre la secreción de insulina dependiente de los canales de K^+ podría tener efectos similares a las sulfonilureas y/o meglitinidas para promover la secreción de insulina por cierre de los canales de K^+ ; pero además activaría la cascada de señalización iniciada en el receptor de GLP-1 para aumentar la secreción de insulina dependientes de PKA (Garber & Spann, 2008; Hui et al., 2005; Prabhakar & Doble, 2011), porque *Lm70EtOH* tuvo un efecto dependiente de PKA y PKC. Por otro lado, debido al aumento de captación de glucosa por *Lm70EtOH* en los adipocitos, su efecto se relacionaría con fármacos sensibilizadores para la captación de glucosa en adipocitos, hígado y tejidos periféricos (biguanidas, metformina, tiazolidinediones) (Coughlan et al., 2014; Song, 2016). Pero es solo una propuesta que debe ser analizada con mayor detalle por otros mecanismos y con fracciones o compuestos aislados del extracto.

8. CONCLUSIONES

- *Lm70EtOH* y *Ss70EtOH* disminuyen el nivel de glucosa plasmática en ratones Swiss albino normoglicémicos y ratones hiperglicémico inducido.
- *Lm70EtOH* disminuye el nivel de glucosa en animales, debido al incremento de los niveles de insulina en células β pancreáticas y la captación de glucosa en adipocitos primarios.
- *Lm70EtOH* incrementa la secreción de insulina principalmente a través de la señalización por PKA y PKC, y también dependiente de los canales de K^+ y Ca^{2+} .
- La secreción de insulina por *Lm70EtOH* se potenciaría por la elevada expresión de *Ins* y *Glut2* en islotes pancreáticos.
- La captación de glucosa por *Lm70EtOH* estaría relacionada con una mayor expresión génica de *Insr* y *Glut4* en adipocitos primarios.
- *Ss70EtOH* disminuye el nivel de glucosa plasmática en ratones, pero no estaría relacionado con el aumento en la secreción de insulina en islotes, tampoco a través de la captación de glucosa en adipocitos.

9. RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES

Varios son los mecanismos modulados en la secreción de insulina mediada por el extracto crudo de *Lm70EtOH*, por lo que se propone dilucidar el efecto individual de los componentes mayoritarios. Además medir la expresión génica de otros genes relacionados a la homeostasis de la glucosa, debido al efecto interesante de *Lm70EtOH* sobre la expresión de los genes evaluados en este trabajo.

Por otro lado, se recomienda estudiar el mecanismo por el que *Lm70EtOH* incrementa la captación de glucosa en adipocitos, y cuales son diferentes mecanismos celulares involucrados, si son dependientes o independientes de la señalización de insulina.

Respecto a *S. sonchifolius* se recomienda realizar estudios sobre otros blancos terapéuticos en la diabetes mellitus tipo 2, por ejemplo su actividad sobre en la gluconeogénesis a nivel hepático y la absorción de glucosa a nivel intestinal.

10. Agradecimiento

Quiero agradecer a Dios primeramente por esta linda oportunidad de vida y a todas las personas quienes pusieron una parte de ellos para hacer posible la realización de esta tesis y alcanzar los objetivos planificados durante estos dos años. En particular, me gustaría expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Dr **Eduardo Gonzales**, mi asesor de tesis, por permitirme trabajar en este lindo proyecto de diabetes mellitus tipo 2, y por su valioso apoyo durante el desarrollo de esta tesis. Además por compartirme algunas de sus muchas experiencias y conocimientos en el campo de la investigación y su pasión por el estudio de terapias en la diabetes.

Dra **Silvia T. Zambrana**, mi asesora de tesis, por ser la persona que creyó en mí y me dio la oportunidad de trabajar juntamente con ella, de la cual me siento muy afortunado. Además siendo una guía constante, ha sido la persona que me ayudo a desarrollar conocimientos, aptitudes, herramientas valiosas que me permitieron alcanzar los objetivos del trabajo de investigación. Su ayuda fue muy valioso, desde el inicio del proyecto, invirtiendo mucho de su tiempo en la revisión, dándome comentarios y sugerencias enriquecedores en el diseño experimental, el análisis de datos, la revisión los manuscritos, etc. También, me gustaría agradecer por permitirme tomar decisiones y adquirir confianza en el trabajo de laboratorio, lo que me ayuda a crecer como investigador y profesional. Finalmente agradecer, por su paciencia, motivación, entusiasmo, y por compartir su experiencia y su conocimiento abundantemente. Sin su guía y persistente ayuda en esta tesis no hubiera sido posible.

También mis agradecimientos a las personas del área de Farmacología, del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, sin especial orden; **Virginia Veliz**, por compartir momentos de trabajo y su ayuda en muchas ocasiones; **Mabel Canaviri**, por ayudarme a conocer las condiciones de trabajo de laboratorio y en los experimentos de investigación; **María del Pilar Gutiérrez**, **Deysi Mamani**, por su ayuda y colaboración; **Jorge Serrudo**, por su amistad y su innumerable ayuda en el corto tiempo como asistente de investigación. A todos ellos, por ser excelentes personas y profesionales, por crear un ambiente de trabajo disfrutable, compartiendo

conocimientos científicos y compartir momentos como en familia. También a **Josué Barral**, del Instituto de Genética, Facultad de Medicina, por disponer de su tiempo para ayudarme en el cuidado y manejo del equipo de PCR en tiempo real y explicarme algunos detalles del análisis de resultados. Así como también a la **Dra. Noemí Tirado**, por permitirme ingresar al Instituto de Genética y utilizar el equipo.

A mis compañeros de la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas – Decima versión; **Ximena Padilla**, **Diandra Arévalo**, **Freddy Chambi**, **Joaquín Solíz**, **Virginia Veliz**, **Sonia Jiménez**, por ser excelentes personas y profesionales, además de compartir actividades académicas y su espíritu de colaboración.

A la persona que me debo todo, la que luchó e hizo posible que yo estudiara desde niño y creyó que algún día su sacrificio iba ser recompensado, **Asunta Calle**, mi querida madre. Quien me apoyo en todo momento, preocupándose por mi bienestar, y rogando a Dios para que todo me vaya bien. Además a mis hermanos, quienes me animaron a seguir.

A la cooperación sueca **ASDI/SAREC** por financiar el proyecto Diabetes mellitus tipo 2: Nuevas terapias, y al Departamento de Investigación Postgrado, e Interacción Social (**DIPGIS**) de la Universidad Mayor de San Andrés, quienes gestionaron el soporte económico mediante la Beca Maestría.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, M., Juklová, M., Bajer, T., Eisner, A., & Ventura, K. (2005). Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *Journal of Chromatography A*, 1084(1–2), 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.072>
- Aguayo-Mazzucato, A. Koh, I. El Khattabi, W.-C. Li, E. Toschi, A. Jermendy, K. Juhl, K. Mao, G. C. Weir, A. Sharma, and S. B.-W. (2012). Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia*, 54(3), 583–593. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-2026-z>
- Aguilar-Bryan, L; Nichols, C G; Wechsler, S W ; Clement, J P; Boyd, A E; Gonzalez, G; Herrera-Sosa, H; Nguy, K; Bryan, J & Nelson, D. A. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfunylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*, 268, 423–426.
- Ahmed, M. S., Pelletier, J., Leumann, H., Gu, H. F., & Östenson, C. G. (2015). Expression of protein kinase C isoforms in pancreatic islets and liver of male Goto-Kakizaki rats, a model of type 2 diabetes. *PLoS ONE*, 10(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141292>
- Al-hasani, H., Yver, D. R., & Cushman, S. W. (1999). Overexpression of the glucose transporter GLUT4 in adipose cells interferes with insulin-stimulated translocation, 460, 338–342.
- Andrali, S. S., Sampley, M. L., Vanderford, N. L., & Ozcan, S. (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *The Biochemical Journal*, 415(1), 1–10. <https://doi.org/10.1042/BJ20081029>
- Arion, W. J., Canfield, W. K., Ramos, F. C., Schindler, P. W., Burger, H., Hemmerle, H., ... Herling, A. W. (1997). Chlorogenic Acid and Hydroxynitrobenzaldehyde : New Inhibitors of Hepatic Glucose 6-Phosphatase 1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(2), 315–322.
- Ashcroft, F. M. (1996). Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas. *Hormone and Metabolic Research*, 28(2), 187–189. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979837>
- Attie, A. D. (2015). How do reducing equivalents increase insulin secretion? *Journal of Clinical Investigation*, 125(10), 3754–3756. <https://doi.org/10.1172/JCI84011>
- Aybar, M. J., Sánchez Riera, A. N., Grau, A., & Sánchez, S. S. (2001). Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00351-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00351-2)
- Baldeón, M. E., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., & Fornasini, M. (2012). Hypoglycemic effect of cooked *Lupinus mutabilis* and its purified alkaloids in subjects with type-2 diabetes. *Nutrición Hospitalaria*, 27(4), 1261–6. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5761>
- Barceló, A., & Rajpathak, S. (2001). Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 10(5), 300–308. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892001>
- Barker, C; Leibiger, B & Berggren, P. (2002). Phosphorylated inositol compounds in beta cell stimulus-response coupling. *Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, 283(6), E1113-1122.

- Baroni, S., Suzuki-Kemmelmeier, F., Caparroz-Assef, S. M., Cuman, R. K. N., & Bersani-Amado, C. A. (2008). Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(3), 521–530. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000>
- Bassoli, B. K., Cassolla, P., Borba-murad, G. R., Constantin, J., Salgueiro-pagadigorria, C. L., & Bazotte, R. B. (2008). Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test : effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function*, 26, 320–328. <https://doi.org/10.1002/cbf>
- Bastani, B., Yang, L., Baldassare, J. J., Polio, D. A., & Gardner, J. D. (1995). Cellular distribution of isoforms of protein kinase C (PKC) in pancreatic acini. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, 1269, 307–315.
- Belfiore, A., Genua, M., & Malaguarnera, R. (2009). PPAR- γ Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling : Implications for Cancer, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/830501>
- Biden, T. J., Schmitz-peiffer, C., Burchfield, J. G., Gurisik, E., Cantley, J., & Mitchell, C. J. (2010). The diverse roles of protein kinase C in pancreatic β -cell function, 36(2008), 916–919. <https://doi.org/10.1042/BST0360916>
- Bosch, R. R., Bazuine, M., Span, P. N., Willems, P. H. G. M., Olthaar, A. J., van Rennes, H., ... Sweep, C. G. J. F. (2004). Regulation of GLUT1-mediated glucose uptake by PKC λ -PKC β (II) interactions in 3T3-L1 adipocytes. *The Biochemical Journal*, 384(February 2016), 349–355. <https://doi.org/10.1042/BJ20040797>
- Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., ... Rorsman, P. (2008). Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic B-Cells : Secretion electrophysiological characterization and role in Insulin Secretion. *Diabetes*, 57, 1618–1628. <https://doi.org/10.2337/db07-0991>.M.B.
- Bruce, R. E. D. and S. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156(0), 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>.What
- Bruns, R. F., Miller, F. D., Merriman, R. L., Howbert, J. J., Heath, W. F., Kobayashi, E., ... Nakano, H. (1991). Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176(1), 288–293.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., & Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2334–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>
- Campos, D., Betalleluz-pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-galvez, A., & Noratto, G. (2012). Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp . & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135(3), 1592–1599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.088>
- Carroll, P. B., Li, M., Rojas, E., & Atwater, I. (1988). The ATP-sensitive potassium channel in pancreatic B-cells is inhibited in physiological bicarbonate buffer, 234(1), 208–212.
- Carvalho, E., Kotani, K., Peroni, O. D., & Kahn, B. B. (2005). Adipose-specific

- overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 289(4), E551–E561.
- Chawla, A., Nguyen, K. D., & Goh, Y. P. S. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 738–749. <https://doi.org/10.1038/nri3071>
- Chen, L., Alam, T., Johnson, J. H., Hughes, S., Newgard, C. B., & Unger, R. H. (1990). Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(11), 4088–92.
- Chen, Y., Wang, Y., Zhang, J., Deng, Y., Jiang, L., Song, E., ... Lippincott-schwartz, J. (2005). Rab10 and myosin-Va mediate insulin-stimulated GLUT4 storage vesicle translocation in adipocytes, 198(4), 545–560. <https://doi.org/10.1083/jcb.201111091>
- Choque Delgado, G. T., da Silva Cunha Tamashiro, W. M., Maróstica Junior, M. R., & Pastore, G. M. (2013). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(3), 222–228. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0362-0>
- Cook, Daniel & Hales, N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311(20), 271–273.
- Coughlan, K. A., Valentine, R. J., Ruderman, N. B., & Saha, A. K. (2014). AMPK activation: A therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7(JUNE), 241–253. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S43731>
- Cross, Daren; Alessi, Dario; Cohen, Philip; Andjelkov, Mirjana & Hemmings, B. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature Publishing Group*, 378, 375–379.
- D'hahan, N., Moreau, C., Prost, a L., Jacquet, H., Alekseev, a E., Terzic, a, & Vivaudou, M. (1999). Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), 12162–12167. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.12162>
- Dai, C., Brissova, M., Hang, Y., Thompson, C., Poffenberger, G., Shostak, A., ... Powers, A. C. (2012). Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets. *Diabetologia*, 55(3), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2369-0>
- Danielsson, A. (2007). Insulin signalling in human adipocytes – mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes.
- Danielsson A., Öst A., Lystedt E., Kjolhede P., Gustavsson J., N. F. H. and S. P. (2005). Insulin resistance in human adipocytes occurs downstream of IRS1 after surgical cell isolation but at the level of phosphorylation of IRS1 in type 2 diabetes. *FEBS J.*, 272, 141–151.
- Davies, L. C., & Philip, R. (2015). Tissue-resident macrophages : then and now. *Immunology*, 541–548. <https://doi.org/10.1111/imm.12451>
- De Oliveira, R. B., De Paula, D. A. C., Rocha, B. A., Franco, J. J., Gobbo-Neto, L., Uyemura, S. A., ... Da Costa, F. B. (2011). Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2),

- 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.019>
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), 2–9. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Domingues, N., Pelletier, J., Ostenson, C. G., & Castro, M. M. C. A. (2014). Therapeutic properties of VO(dmp)2 as assessed by in vitro and in vivo studies in type 2 diabetic GK rats. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 131, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.11.005>
- Efendic, S., Boitard, C., Cerasi, E., Ferrannini, E., & Henquin, J. (2002). Regulation of Insulin Production In Search of Therapeutic Targets. *Diabetes*, 51(3), 285–287.
- Filipsson, K. ; A. B. (1998). Protein Kinase A Inhibition and PACAP – Induced Insulin Secretion in HIT-T15 Cells a. *Annals New York Academic of Sciences*, 441–444.
- Filipsson, K., Kvist-reimer, M., & Ahre, B. (2001). Cyclase – Activating Polypeptide and Islet Function, (17), 1959–1969.
- Fornasini, M; Villacres, E; Castro J; Narvaez, L. and B. M. (n.d.). Efecto hipoglicemiante del *Lupinus mutabilis* y de sus alcaloides purificados en sujetos con disglucemia y con diabetes tipo 2, 3.
- Fornasini, M., Castro, J., Villacres, E., Narvaez, L., Villamar, M. P., & Baldeon, M. E. (2012). Hypoglycemic effect of *Lupinus mutabilis* in healthy volunteers and subjects with dysglycemia. *Nutr Hosp*, 27(2), 425–433. <https://doi.org/10.1590/s0212-16112012000200012>
- Frayn, K. N. (2010). Fat as a fuel: Emerging understanding of the adipose tissue-skeletal muscle axis. *Acta Physiologica*, 199(4), 509–518. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02128.x>
- Gao, Z., Young, R. A., Trucco, M. M., Greene, S. R., Hewlett, E. L., Matschinsky, F. M., & Wolf, B. A. (2002). Protein kinase A translocation and insulin secretion in pancreatic B-cells studies with adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Biochemistry*, 404, 397–404.
- Garber, A., & Spann, S. (2008). An overview of incretin clinical trials. *J Farm Pract*, 57(Suppl 9), S10–S15.
- García, Pedro M ; de la Mora, Garzon; Wysocka, W.; Maiztegui, Barbara; Alzugaray, Maria E; del Zotto, Hector & Borelli, M. I. (2004). Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology*, 504, 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.09.008>
- Geem, D., Medina-contreras, O., Kim, W., Huang, C. S., & Denning, T. L. (2012). Isolation and Characterization of Dendritic Cells and Macrophages from the Mouse Intestine 3 . Antibody Staining for Multi-Color Flow Cytometric Analysis of DCs and Macrophages, (May), 2–7. <https://doi.org/10.3791/4040>
- Genta, S. B., Cabrera, W. M., Grau, A., & Sánchez, S. S. (2005). Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43(11), 1657–1665. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.05.007>
- Genta, S. B., Cabrera, W. M., Mercado, M. I., Grau, A., Catalán, C. A., & Sánchez, S. S. (2010). Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: Constituents of the most active fractions. *Chemico-Biological Interactions*, 185(2), 143–152.
- Genta, S., Cabrera, W., Habib, N., Pons, J., Carillo, I. M., Grau, A., & Sánchez, S.

- (2009). Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition*, 28(2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.01.013>
- Gonzales, E. L., Grados, R. E., Trino, R. D., Gutierrez, M. de P., Espinoza, M. A., Perez, J., ... Espinar, A. M. (2016). *Investigaciones Sobre Las Propiedades Medicinales de Productos Naturales Para La Diabetes y/u Obesidad. Volumen 1: Ensayo Clinico Fase 1 de Suplementos alimenticios a base de Amarantho, Quinoa y/o Tarwi*. (E. L. Gonzales, Ed.) (1ra edicion). La Paz: Instituto de Investigaciones farmaco Bioquimicas- FCFB-UMSA. ISBN: 978-99974-65-94-8
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews. Immunology*, 5(12), 953–64. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Govers, R. (2014). Molecular mechanisms of GLUT4 regulation in adipocytes. *Diabetes and Metabolism*, 40(6), 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2014.01.005>
- Granados, S., Balcázar, N., Guillén, A., & Echeverri, F. (2015). Evaluation of the Hypoglycemic Effects of Flavonoids and Extracts from *Jatropha gossypifolia* L. *Molecules*, 20, 6181–6193.
- Gross, D. N., Farmer, S. R., & Pilch, P. F. (2004). Glut4 storage vesicles without Glut4: transcriptional regulation of insulin-dependent vesicular traffic. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7151–62. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7151-7162.2004>
- Gurrola-díaz, C. M., Borelli, M. I., Przybyl, A. K., García-lópez, J. S., Garzon, P., Mora, D., & García-lópez, P. M. (2008). Insulin secretion Effect of 2,17-Dioxosparteine, 17,Thionosparteine and 17-Hydroxy-Lupanine on Rat Langerhan´s islets. *Proceedings 12th International Lupin Conference*, 484–487.
- Habib, N. C., Honoré, S. M., Genta, S. B., & Sánchez, S. S. (2011). Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. *Chemico-Biological Interactions*, 194(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.08.009>
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1365–1402. <https://doi.org/10.3390/ijms11041365>
- Hashimoto, N., Kido, Y., Uchida, T., Matsuda, T., Suzuki, K., Inoue, H., ... Ohno, S. (2005). PKC λ regulates glucose-induced insulin secretion through modulation of gene expression in pancreatic β cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(1). <https://doi.org/10.1172/JCI200522232.138>
- Hashiramoto, M., & James, D. E. (2000). Characterization of Insulin-Responsive GLUT4 Storage Vesicles Isolated from 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1), 416–427.
- Hauer, H. (2002). The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 18(SUPPL. 2), 10–15. <https://doi.org/10.1002/dmrr.249>
- Henquin, J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49(11), 1751–60. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1751>
- Henquin, J. C., & Meissner, H. P. (1982). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes and membrane potential in pancreatic B cells.

- Biochemical Pharmacology*, 31(7), 1407–1415. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90036-3)
- Hoa, N. K., Norberg, A., Sillard, R., Van Phan, D., Thuan, N. D., Dzung, D. T. N., ... Ostenson, C.-G. (2007). The possible mechanisms by which phanoside stimulates insulin secretion from rat islets. *The Journal of Endocrinology*, 192(2), 389–394. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06948>
- Hoa, N. K., Phan, D. V., Thuan, N. D., & Östenson, C. G. (2004). Insulin secretion is stimulated by ethanol extract of *Anemarrhena asphodeloides* in isolated islet of healthy wistar and diabetic Goto-Kakizaki rats. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 112(9), 520–525. <https://doi.org/10.1055/s-2004-821309>
- Honoré, S. M., Cabrera, W. M., Genta, S. B., & Sánchez, S. S. (2012). Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1704–1715. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.073>
- Hotamisligil, G. S. (2000). Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte.
- Huang, S., & Czech, M. P. (2007). Review The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, (April), 237–252. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006>
- Hui, H., Zhao, X., & Perfetti, R. (2005). Structure and function studies of Glucoagon-like Peptide-1 (GLP-1): The Designing of a novel Pharmacological Agent for the treatment of Diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 21, 313–331.
- Im, S.-S., Kwon, S.-K., Kim, T.-H., Kim, H.-I., & Ahn, Y.-H. (2007). Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life*, 59(3), 134–145. <https://doi.org/10.1080/15216540701313788>
- In't Veld, Peter & Marichal, M. (2010). Microscopic anatomy of the Human Islets of Langerhans. In *The Islets of Langerhans* (Vol. 654, pp. 629–632). <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3>
- Inagaki, N; Gonoi, T; Clement, J P; Namba, N; Inazawa, J; Gonzalez, G; Aguilar-Bryan, L; Seino, S & Bryan, J. (1995). Reconstitution of IKATP an inward rectifier subnit plus the sulfunylurea receptor. *Science*, 270, 1166–1170.
- Jacobsen, S. E., Mujica, A., Jacobsen, S.-E., & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botanica Economica de Los Andes Centrales- Universidad Mayor de San Andrés*, 458–482.
- Jeon, H. J., Choi, H. S., Lee, Y. J., Hwang, J. H., Lee, O. H., Seo, M. J., ... McPhee, D. J. (2015). Seapolynol extracted from *Ecklonia cava* inhibits adipocyte differentiation in vitro and decreases fat accumulation in vivo. *Molecules*, 20(12), 21715–21731. <https://doi.org/10.3390/molecules201219796>
- Jitrapakdee, S., Forbes, B. E., & Science, B. (2002). Insulin Secretion and Actions, 3–27.
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*, 383(9922), 1068–1083. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)
- Kane, S., Sano, H., Liu, S. C. H., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. C., & Lienhard, G. E. (2002). Accelerated Publication A Method to Identify Serine, 22115–22119. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200198200>
- Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S, W. G. (2002). Involvement of c-Jun

- N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 30010– 30018.
- Kang, L., He, Z., Xu, P., Fan, J., Betz, A., Brose, N., & Xu, T. (2006). Munc13-1 is required for the sustained release of insulin from pancreatic β cells. *Cell Metabolism*, 3(6), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.012>
- Kataoka, K., Han, S., Shioda, S., Hirai, M., Nishizawa, M., & Handa, H. (2002). MafA Is a Glucose-regulated and Pancreatic β -Cell-specific Transcriptional Activator for the Insulin Gene *. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49903–49910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206796200>
- Kershaw, EE & Flier, J. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2548–2556.
- Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., & Hara, M. (2009). Islet architecture: A comparative study. *Islets*, 1(2), 129–136. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>
- Kim, M.-J., Lee, Y.-S., Lee, K.-H., Min, D. S., Yoon, S.-H., Hahn, S. J., ... Jo, Y.-H. (2001). Site-Specific Localization of Protein Kinase C Isoforms in Rat Pancreas. *Pancreatology*, 1(1), 36–42. <https://doi.org/10.1159/000055790>
- Komatsu, M., Sato, Y., Yamada, S., Yamauchi, K., Hashizume, K., & Aizawa, T. (2002). Triggering of Insulin Release by a Combination of cAMP. *Diabetes*, 51(february S1), s29–s32.
- Kroc, M., Rybinski, W., Wilczura, P., Kaczmarek, Z., Kamel, K., Barzyk, P., & Swiecicki, W. (2016). Quantitative and qualitative analysis of alkaloids composition in the seeds of a white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0473-1>
- Kupriyanova, T. A., Kandror, V., & Kandror, K. V. (2002). Isolation and Characterization of the Two Major Intracellular Glut4 Storage Compartments *, 277(11), 9133–9138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106999200>
- La Razon, S. Casos de Diabetes mellitus en Bolivia (2015).
- Lachman, J., Fernández, E. C., & Orsák, M. (2003). Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use - A review. *Plant, Soil and Environment*, 49(6), 283–290.
- Lacy, P. (2010). The pancreatic Beta Cell: Structure and Function. *The New England Journal of Medicine*, 276(4), 1967. <https://doi.org/10.1056>
- Lazo de la vega, M. L., & Fernández-mejía, C. (2009). Factores transcripcionales en la célula β adulta. *Rincon de Residente*, 61, 428–446.
- Lee, B., & Lee, J. (2014). Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, 1842(3), 446–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.017>
- Leibiger, I. B., Leibiger, B., & Berggren, P. (2008). Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annual Review of Nutrition*, 28, 233–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155530>
- Leney, S. E., & Tavaré, J. M. (2001). The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake : signalling , trafficking and potential drug targets. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0037>
- Li, L., & Chin, L. (2003). Cellular and Molecular Life Sciences The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis, 60, 942–960.

- <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2240-7>
- Lin, Y., & Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*, 204(1), 1–11. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0260>
- Linnemann, A. R., Nout, M. J. R., & Koziol, M. (2016). Lupinus mutabilis : Composition , Uses , Toxicology , and Debittering. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1454–1487. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772089>
- Lippiat, J. D., Albinson, S. L., Ashcroft, F. M., Nh, T., & Atp-sensitive, C. (2002). Interaction of the Cytosolic Domains of the Kir6.2 Subunit of the K ATP Channel Is Modulated by Sulfonylureas. *Diabetes*, 51, 377–380.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lovati, M. R., Manzoni, C., Castiglioni, S., Parolari, A., Magni, C., & Duranti, M. (2017). Lupin seed g -conglutin lowers blood glucose in hyperglycaemic rats and increases glucose consumption of HepG2 cells, (2012), 67–73. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002601>
- Macdonald, P. E., El-kholy, W., Riedel, M. J., Salapatek, A. M. F., Light, P. E., & Wheeler, M. B. (2002). The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes*, 51(Suppl. 3), S434–S442.
- Mayta, P., Payano, J., Peláez, J., Pérez, M., Pichardo, L., & Puycan, L. (2004). Reducción de la respuesta glicémica posprandial post-ingesta de raíz de yacón en sujetos sanos. *CIMEL Ciencia E Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 9(1), 7–11. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=71790102>
- Melloul, D., Marshak, S., & Cerasi, E. (2002a). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, 45(3), 309–326. <https://doi.org/10.1007/s00125-001-0728-y>
- Melloul, D., Marshak, S., & Cerasi, E. (2002b). Regulation of pdx-1 Gene Expression. *Diabetes*, 51(3), S320-s325.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism : A Review, 2013.
- Miller, R. S., Becker, K. G., Prabhu, V., & Cooke, D. W. (2008). Adipocyte Gene Expression Is Altered in Formerly Obese Mice and As a Function of Diet Composition. *Journal Nutrition*, 138(6), 1033–1038.
- Miura, T., Itoh, Y., Ishida, T. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic activity of the leaf of *Samallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. *Journal of Traditional Medicines*.
- Miura, T., Kako, M., Ishihara, E., Usami, M., Yano, H., Tanigawa, K., ... Seino, Y. (1997). Antidiabetic effect of Seishin-kanro-to in KK-Ay mice. *Planta Medica*, 63(4), 320–322. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957691>
- Muller, D., Huang, G. C., Amiel, S., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2006). Identification of insulin signaling elements in human beta-cells: autocrine regulation of insulin gene expression. *Diabetes*, 55(October), 2835–2842. <https://doi.org/10.2337/db06-0532>
- Muoio, D. M., & Newgard, C. B. (2008). Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes.

- Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 193–205.
<https://doi.org/10.1038/nrm2327>
- Nauck, M. (1998). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetologia*, 35(3), 117–129.
- Nesher, R., Anteby, E., Yedovizky, M., Warwar, N., Kaiser, N., & Cerasi, E. (2002). B-Cell Protein Kinases and the Dynamics of the Insulin Response to Glucose. *Diabetes*, 51(Suppl. 1), S68–S73.
- Norberg, Å., Nguyen, K. H., Liepinsh, E., Van Phan, D., Nguyen, D. T., Jörnvall, H., ... Östenson, C. G. (2004). A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41361–41367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403435200>
- Öberg, A. I., Yassin, K., Csikasz, R. I., Dehvari, N., Shabalina, I. G., Hutchinson, D. S., ... Bengtsson, T. (2011). Shikonin increases glucose uptake in skeletal muscle cells and improves plasma glucose levels in diabetic Goto-Kakizaki rats. *PLoS ONE*, 6(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022510>
- Ojansivu, I., Ferreira, C. L., & Salminen, S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science and Technology*, 22(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.005>
- Oliveira, G. O., Braga, C. P., & Fernandes, A. A. H. (2013). Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)] treatment. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.050>
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman Medical Journal*, 27(4), 269–273. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.68>
- Olsson, A. H., Volkov, P., Bacos, K., Dayeh, T., Hall, E., Nilsson, E. A., ... Ling, C. (2014). Genome-Wide Associations between Genetic and Epigenetic Variation Influence mRNA Expression and Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *PLoS Genetics*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004735>
- PaginaSiete. En Bolivia hay 90.000 casos de diabetes, en 5 años se duplicarán (2016). Retrieved from <http://www.paginasiete.bo/sociedad/2016/4/7/bolivia-90000-casos-diabetes-anos-duplicaran-92381.html>
- Pang, K., Mukonoweshuro, C., & Wong, G. G. (1994). Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Glut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(September), 9559–9563.
- Paolisso, G., Nenquin, M., Schmeer, W., Mathot, F., Meissner, H. P., & Henquin, J. C. (1985). Sparteine increase Insulin release by decreasing the K⁺ permeability of the B-cell membrane. *Biochemical Pharmacology*, 34(13), 2355–2361.
- Pedreschi, R., Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Andean Yacon Root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp . Endl) Fructooligosaccharides as a Potential Novel Source of Prebiotics. *J. Agric. Food Chem.*, 51(18), 5278–5284. <https://doi.org/10.1021/jf0344744>
- Peluso, Gianfranco; De Feo, Vincenzo; De Simone, Francesco; Bresciano, Elio & Voutto, M. L. (1995). Studies On The Inhibitory Effects Of Caffeoylquinic Acids On Monocyte Migration And Superoxide. *Journal of Natural Products*, 58(5), 639–646.
- Pillai, R., & Joseph, J. W. (2010). Distinct Role for ARNT / HIF-1 β in Pancreatic Beta-

- Cell Function , Insulin Secretion and Type 2 Diabetes, 2.
- Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R. P., & Harmon, J. S. (2006). Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *The Journal of Nutrition*, 136(December 2005), 873–876. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16549443
- Prabhakar, P. K., & Doble, M. (2011). Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 17(8), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s11655-011-0810-3>
- Qiu, Ying-Kun; Kang, Ting-Guo; Dou, De-Qiang; Liang, L. & D. F. (2008). Journal of Asian Natural Products Research Three novel compounds from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(12), 1109–1115. <https://doi.org/10.1080/10286020802361230>
- Qiu, Y., Shan, B., Yang, L., & Liu, Y. (2016). Adipose tissue macrophage in immune regulation of metabolism, 59(12), 1232–1240. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0155-1>
- Rajan, S. S., & Longhi, M. P. (2016). Dendritic cells and adipose tissue. *Immunology*, 353–361. <https://doi.org/10.1111/imm.12653>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Rorsman, P., & Renström, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 46(8), 1029–1045. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1153-1>
- Ruiz, M. A., & Sotelo, A. (2001). Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican wild lupinst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5336–5339. <https://doi.org/10.1021/jf010247v>
- Satin, LS & Cook, D. (1985). Voltage-gated Ca^{2+} current in pancreatic B-cells. *Pflügers Archives*, 404, 385–387.
- Seino, S. (2005). PKA-Dependent and PKA-Independent Pathways for cAMP-Regulated Exocytosis. *Physiological Reviews*, 85(4), 1303–1342. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2005>
- Shigeto, M., Ramracheya, R., Tarasov, A. I., Cha, C. Y., Chibalina, M. V., Hastoy, B., ... Rorsman, P. (2015). GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), 4714–4728. <https://doi.org/10.1172/JCI81975>
- Siddle, K. (2011). Signalling by insulin and IGF receptors : supporting acts and new players. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0022>
- Simonovska, B., Vovk, I., Andrenšek, S., Valentová, K., & Ulrichová, J. (2003). Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, 1016(1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01183-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01183-X)
- Singh, R., Kaur, N., Kishore, L., & Kumar Gupta, G. (2013). Management of diabetic complications: A chemical constituents based approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.051>
- Song, R. (2016). Mechanism of metformin: A tale of two sites. *Diabetes Care*, 39(2),

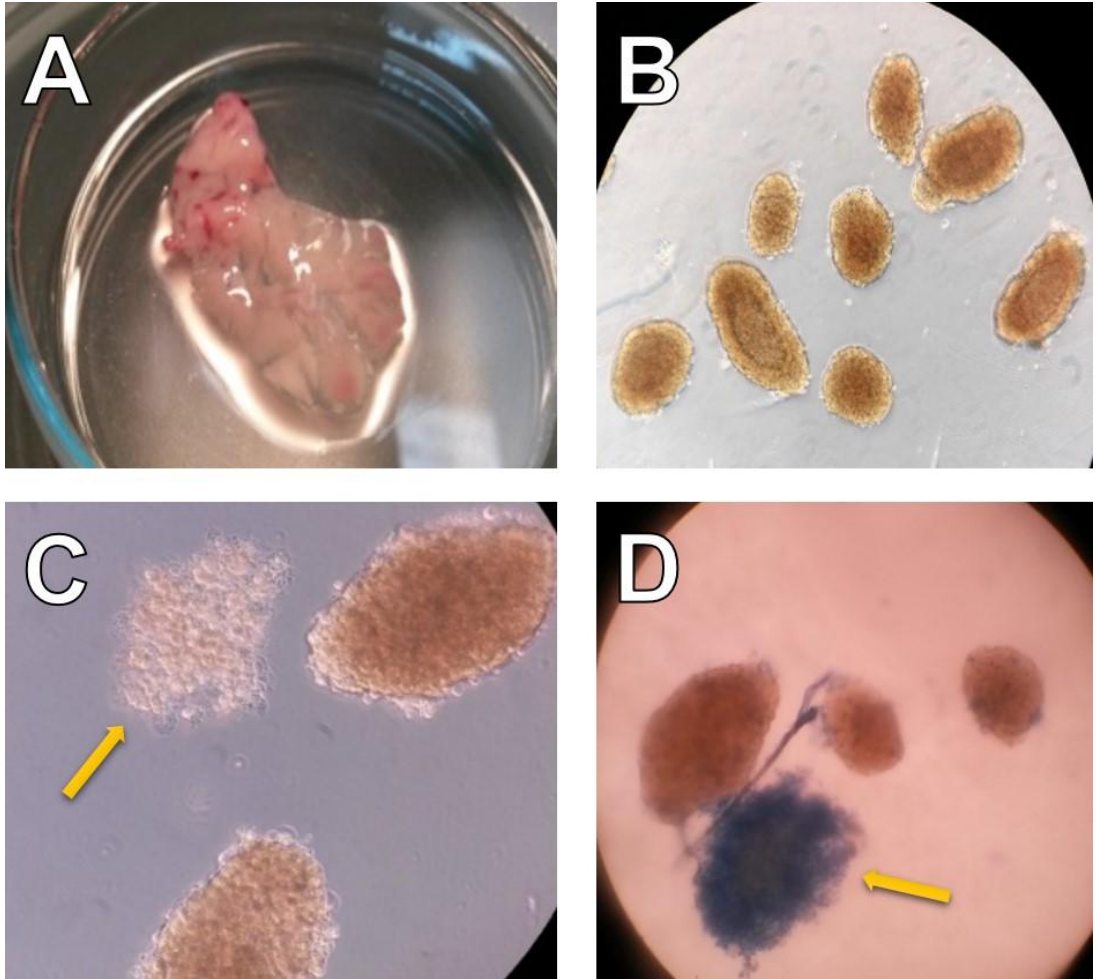
- 187–189. <https://doi.org/10.2337/dci15-0013>
- Srivastava, M., Atwater, I., Glasman, M., Leighton, X., Goping, G., Caohuy, H., ... Pollard, H. B. (1999). Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca²⁺ signaling, and insulin secretion in the anx7(+/-) knockout mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13783–13788. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13783>
- Steiner, D. J., Kim, A., Miller, K., & Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, 2(3), 135–145. <https://doi.org/10.4161/isl.2.3.11815>
- Stienstra, R., Haim, Y., Riahi, Y., Netea, M., Rudich, A., & Leibowitz, G. (2014). Autophagy in adipose tissue and the beta cell: Implications for obesity and diabetes. *Diabetologia*, 57(8), 1505–1516. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3255-3>
- Straub, SG & Sharp, G. (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin insulin secretion. *Diabetes/Metabolism Research Reviews*, 18, 451–463.
- Stull, N. D., Breite, A., McCarthy, R., Tersey, S. a., & Mirmira, R. G. (2012). Mouse Islet of Langerhans Isolation using a Combination of Purified Collagenase and Neutral Protease. *Journal of Visualized Experiments*, (September), 3–7. <https://doi.org/10.3791/4137>
- Svobodová, E., Dvořáková, Z., Čepková, P. H., Viehmannová, I., Havlíčková, L., Cusimamani, E. F., ... Meza Zela, G. (2013). Genetic diversity of yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) and its wild relatives as revealed by ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.05.007>
- Takenaka, Makiko; Yan, Xiaojun; Ono, Hiroshi; Yoshida, Mitsuru; Nagata, Tadahiro & Nakanishi, T. (2003). Caffeic Acid Derivatives in the Roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 793–796.
- Tan, S., Fisher-wellman, K. H., Fazakerley, D. J., Ng, Y., Pant, H., Li, J., ... James, D. E. (2015). Selective Insulin Resistance in Adipocytes *, 290(18), 11337–11348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.623686>
- Terruzzi, I., Senesi, P., Magni, C., Montesano, A., Scarafoni, A., Luzi, L., & Duranti, M. (2011). Insulin-mimetic action of conglutin-g , a lupin seed protein , in mouse myoblasts. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(3), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.09.004>
- Thams, P., Anwar, M. R., & Capito, K. (2005). Glucose triggers protein kinase A-dependent insulin secretion in mouse pancreatic islets through activation of the K⁺ ATP channel-dependent pathway. *European Journal of Endocrinology*, 152(4), 671–677. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01885>
- Thams, P., & Capito, K. (2001). Differential mechanisms of glucose and palmitate in augmentation of insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Diabetologia*, 44(6), 738–746. <https://doi.org/10.1007/s001250051683>
- Trube G, R. P. & O.-S. T. (1986). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent KC channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Archives* ., 407, 493–499.
- Ueki, K., Yamamoto-honda, R., Kaburagi, Y., Yamauchi, T., Tobe, K., Burgering, B. M. T., ... Kadowaki, T. (1998). Potential Role of Protein Kinase B in Insulin-

- induced Glucose Transport , Glycogen Synthesis , and Protein Synthesis * , 273(9), 5315–5322.
- Valentová, K., Moncion, A., De Waziers, I., & Ulrichová, J. (2004). The effect of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts on rat hepatic metabolism. *Cell Biology and Toxicology*, 20(2), 109–120.
- Valentová, K., Stejskal, D., Bartek, J., Dvořáčková, S., Křen, V., Ulrichová, J., & Šimánek, V. (2008). Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: In vivo safety assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3), 1006–1013.
- Valentová, K., & Ulrichová, J. (2003). *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* - prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palack??, Olomouc, Czechoslovakia*, 147(2), 119–130. <https://doi.org/10.5507/bp.2003.017>
- Valladolid-Acebes, I., Daraio, T., Brismar, K., Harkany, T., Ogren, S. O., Hokfelt, T. G. M., & Bark, C. (2015). Replacing SNAP-25b with SNAP-25a expression results in metabolic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(31), E4326-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511951112>
- Vega-monroy, M. L. De, & Fernandez-mejia, C. (2011). Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*, 660. <https://doi.org/10.5772/56467>
- Vitrac, Caroline; Ibarra, Alvin; Roller, Marc; Merillon, Jean & Vitrac, X. (2010). Contribution of Chlorogenic Acids to the Inhibition of Human Hepatic Glucose-6-phosphatase Activity in Vitro by Svetol , a Standardized Decaffeinated Green Coffee Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4141–4144. <https://doi.org/10.1021/jf9044827>
- Vos, A. De, Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., & Schuit, F. (1995). Rapid Publication Human and Rat Beta Cells Differ in Glucose Transporter but Not in Glucokinase Gene Expression, 96(November), 2489–2495.
- Waeber, G., Thompson, N., Nicod, P., & Medicine, I. (2014). Transcriptional Activation of the GLUT2 Gene by the IPF-1 / STF- 1 / IDX-1 Homeobox Factor, (September).
- Wajchenberg, B. L., & Cohen, R. (2014). Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease (Nutrition and Health). *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease (Nutrition and Health)*, (MAY 2014), 235–248. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-770-9>
- Wan, Q.-F., Dong, Y., Yang, H., Lou, X., Ding, J., & Xu, T. (2004). Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca²⁺. *The Journal of General Physiology*, 124(6), 653–62. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409082>
- Wang, H., Jiang, Y.-W., Zhang, W.-J., Xu, S.-Q., Liu, H.-L., Yang, W.-Y., & Lou, J.-N. (2012). Differential activations of PKC/PKA related to microvasculopathy in diabetic GK rats. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 302(26), E173–E182. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00184.2011>
- Wang, Z., & Thurmond, D. C. (2009). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton , small GTPases and SNARE proteins.

- <https://doi.org/10.1242/jcs.034355>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–1808.
<https://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(3), 311–321.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>
- Wiedemann, M., Gurrola-díaz, C. M., Vargas-guerrero, B., Wink, M., García-lópez, P. M., & Düfer, M. (2015). Lupanine Improves Glucose Homeostasis by Influencing KATP Channels and Insulin Gene Expression, 19085–19100.
<https://doi.org/10.3390/molecules201019085>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance, 26(May), 19–39.
- Wink, M., Meißner, C., & Witte, L. (1995). Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38(1), 139–153.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)91890-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)91890-D)
- Wu, C., Luan, H., Wang, S., Zhang, X., Wang, R., Jin, L., ... Chen, X. (2013). Modulation of Lipogenesis and Glucose Consumption in HepG2 Cells and C2C12 Myotubes by Sophoricoside. *Molecules*, 18, 15624–15635.
<https://doi.org/10.3390/molecules181215624>
- Yajima H, Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Kaneko T, Nagai M, Sharp GW, Hashizume, K. (1999). cAMP enhances insulin secretion by an action on the ATP-sensitive K⁺ channel independent pathway of glucose signaling in rat pancreatic islets. *Diabetes*, 48(May), 1006–1012.
- Yang, J., Kang, J., & Guan, Y. (2013). The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes. *Frontiers of Medicine*, 7(4), 433–44. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0288-9>
- Yang, K. (2008). *Adipose tissue protocols. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 456). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8_23
- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., ... Takahashi, S. (2005). MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 4969–4976.
<https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.4969>
- Zhang, J. D., Ruschhaupt, M., & Biczok, R. (2015). ddCt method for qRT – PCR data analysis. *Bioconductor*, 1–8.
- Zhao, L., Guo, M., Matsuoka, T., Hagman, D. K., Parazzoli, S. D., Poitout, V., & Stein, R. (2005). The Islet ⁺ Cell-enriched MafA Activator Is a Key Regulator of Insulin Gene Transcription *. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11887–11894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409475200>
- Zmuda, E. J., Powell, C. a, & Hai, T. (2011). A method for murine islet isolation and subcapsular kidney transplantation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (50), 1–11. <https://doi.org/10.3791/2096>

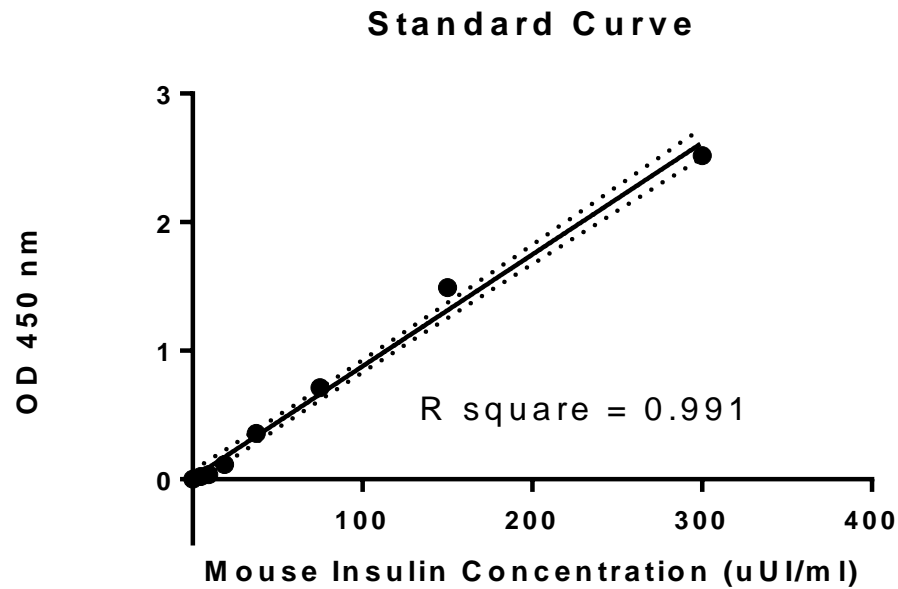
ANEXOS

1. Islotes pancreáticos, morfología y viabilidad celular



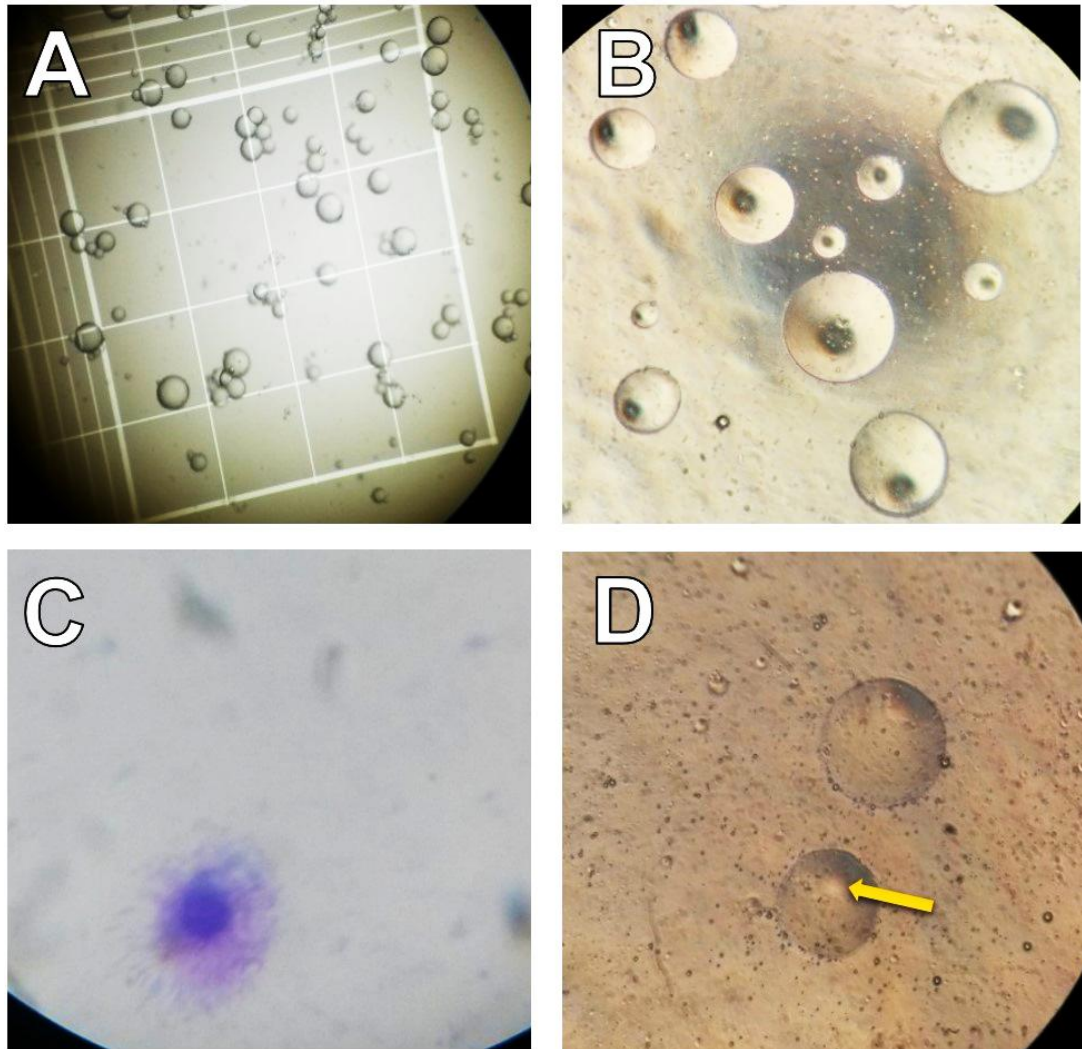
Islotes pancreáticos murinos fueron obtenidos mediante el método de digestión por Colagenasa para la estimulación de secreción de insulina *in vitro*. **(A)** Páncreas de ratón removido posterior a la insuflación con una solución de Colagenasa a través del conducto biliar. **(B)** Islotes pancreáticos con morfología redondeada y con bordes definidos. **(C)** Tejido acinoso pancreático entre dos islotes (**flecha**). **(D)** Ensayo de viabilidad celular con el colorante de exclusión vital (Azul tripán), las células teñidas de azul son las células no viables. 3 islotes pancreáticos con un 96% de viabilidad celular y además del tejido acinoso pancreático totalmente teñido de azul (**flecha**).

2. Curva estándar del ensayo inmuno-enzimático – Insulina



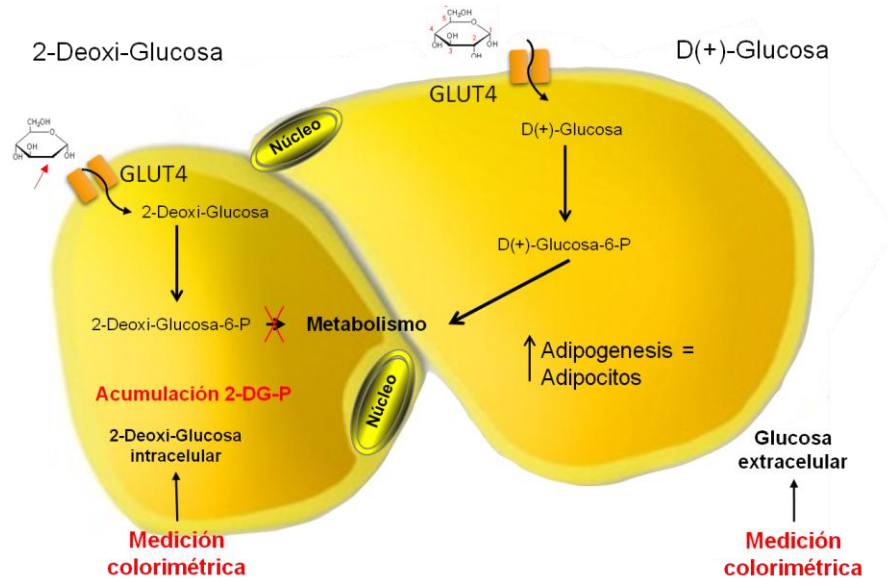
Se realizó diferentes diluciones del estándar para obtener las siguientes concentraciones: 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875 y 0 μ UI/mL de insulina; posteriormente se obtuvieron la densidad óptica (n=2) a través del ensayo inmuno-enzimático (ELISA), a 450 nm de longitud de onda. El coeficiente correlación lineal fue $R^2=0.991$. OD (Optic Density).

3. Adipocitos primarios murinos, características y morfología



Adipocitos primarios murinos fueron obtenidos a partir del epidídimo de ratón a través del método de digestión por Colagenasa. **(A)** Celulas adiposas al momento del conteo de células en un hemocitometro standard (Neubauer chamber) 10X. **(B)** Cultivo de adipocitos murinos al momento de la estimulación de captación de glucosa, a través de un microscopio invertido 20X. **(C)** Tinción panóptica de adipocito, núcleo denso uniforme, con prolongaciones irregulares a través del citoplasma, debido a la coloración de proteínas basófilas (microscopio óptico 100X). **(D)** Morfología de la membrana celular definida de 2 adipocitos, núcleo celular en relieve, localizado en un extremo de la célula (**flecha**), obtenido mediante un microscopio invertido 20X.

4. Diferencia entre el ensayo de captación de glucosa con 2-deoxi-glucosa (método directo) y D(+)-glucosa (método indirecto) en adipocitos primarios



El ensayo de captación de glucosa en adipocitos se puede llevar a cabo basado en dos tipos de métodos; directo e indirecto. El **método directo (izq.)** utiliza **2-deoxi-glucosa**, siendo el método estándar para este tipo de ensayos; la 2-deoxi-glucosa ingresa a las células a través de los transportadores de glucosa 4 (GLUT4), luego es fosforilado por la hexoquinasa, convirtiéndola en 2-deoxi-glucosa-6-P, esta molécula no puede ser metabolizada en la célula, tampoco puede salir debido a la fosforilación, acumulándose dentro de la célula, siendo directamente relacionado a la cantidad de 2-deoxi-glucosa captada. Por otro lado, **el método indirecto (der.)** utiliza D(+)-glucosa, donde la glucosa ingresa a la célula a través del GLUT4, también es convertida por fosforilación a D(+)-glucosa-6-P, y esta es metabolizada a través de la glucólisis, posteriormente acoplada a la ruta de la adipogénesis en adipocitos. Este método nos ayuda a determinar la glucosa restante en el medio, es decir, aquello que no fue captado o introducido por los transportadores hacia la célula, siendo la captación de glucosa inversamente proporcional a la cantidad restante en el medio. Ambos métodos son colorimétricos.

5. Certificado de Aval Ético para el trabajo con Animales de experimentación.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LA UMSA
CEI - UMSA
Resolución Honorable Consejo Universitario No. 125/10

CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO
Código de Registro: CEI-UMSA0115

A quien corresponda,
El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Mayor de San Andrés (CEI-UMSA), en el marco del Convenio UMSA – ASDI y el proyecto aprobado por la cooperación Sueca ‘Diabetes tipo II: Nuevas terapias’, ha recibido para su evaluación y aval ético el Estudio Doctoral:

Título del Estudio: ‘Evaluación de la actividad anti-diabética de plantas Bolivianas potencialmente nutraceuticas’
Coordinador, Asesor responsable: Eduardo Gonzáles Dávalos
Doctoranda: Silvia Zambrana Santander
Institución proponente: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas

El estudio fue evaluado bajo la normativa internacional en ética de la investigación (Pautas CIOMS/OMS; Helsinki/AMM, Ezekiel Emanuel), en la que se incluyen los principios y criterios éticos que se deben tomar en cuenta para investigaciones que involucran seres vivos, entre estos:

Valides social (la pertinencia, atingencia y relevancia del proyecto/estudio)
Selección equitativa del sujeto (tamaño de la muestra, criterios de inclusión / exclusión, etc.)
Relación favorable del riesgo/beneficio (que el riesgo sea mínimo y el beneficio mayor del estudio)

Una vez evaluado el Estudio, así como las correcciones/complementaciones realizadas por el equipo investigador, el CEI-UMSA certifica que el estudio ‘Evaluación de la actividad anti-diabética de plantas Bolivianas potencialmente nutraceuticas’ cumple con los requisitos éticos para el trabajo en ratas y ratones de laboratorio, por lo que le otorga el presente **CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO** para este componente.

La emisión de este AVAL es válida solo para este estudio y **obliga al equipo de investigadores**, al fiel cumplimiento y compromiso de desarrollo de actividades, en el marco de lo propuesto, corregido y recomendado; lo contrario, podría dar lugar a la revocación de este AVAL.


Dra. Katty Terrazas Aranda, M.Sc., Ph.D.
Coordinador Comité de Ética de la Investigación
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS


Dr. Alberto Quevedo Iriarte, Ph.D.
VICERRECTOR
Presidente Comité de Ética de la Investigación
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS



La Paz, Octubre de 2015
Cc/ Coordinación del Proyecto., DIPGIS., CEI-UMSA

Av. Villazón N° 195, Monoblock, Piso 1 Telf. (591-2) 2440493
e-mail: cei@umsa.bo - La Paz - Bolivia