

## ***Cecropia pachystachya* protection against preproIAPP cytotoxicity is independent of Ca<sup>2+</sup> homeostasis: lessons learned using a novel yeast model of preproIAPP-induced Ca<sup>2+</sup> intracellular dysregulation**

*Efeito protetor de Cecropia pachystachya contra a citotoxicidade do preproIAPP é independente da homeostasia do Ca<sup>2+</sup>: conhecimento revelado por um modelo de levedura de desregulação de Ca<sup>2+</sup> mediada pelo preproIAPP*

**Sofia Ferreira <sup>1</sup>, Rejane G. Tavares <sup>1,2</sup>, Ana F. Raimundo <sup>3,4,5</sup>, Francieli M. Stefanello <sup>6</sup>, Flavio H. Reginatto <sup>7</sup>, Nuno Saraiva <sup>1</sup>, Regina Menezes <sup>1,3,5\*</sup>**

<sup>1</sup>CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; <sup>3</sup>iBET - Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal; <sup>4</sup>ITQB-NOVA, Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2781-157 Oeiras, Portugal; <sup>5</sup>CEDOC, NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, 130, 1169-056 Lisboa, Portugal; <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil; <sup>7</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

\*corresponding author / autor para correspondência: regina.menezes@ulusofona.pt

### **Abstract**

Despite the progresses in therapeutics, type 2 diabetes is still an epidemic with alarming numbers worldwide. New strategies for prevention and treatments are imperative. A venue of research with potential is the aggregation of Islet Amyloid PolyPeptide (IAPP), a contributor to pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. To address the impact of IAPP on calcium (Ca<sup>2+</sup>) signalling, we developed a dual reporter yeast model independently expressing preproIAPP-GFP (ppIAPP) and encoding the *lacZ* gene under the control of Crz1-recognition elements. In this reporter system, ppIAPP induced Crz1 hyperactivation, a yeast transcription factor activated by the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin/calcineurin pathway, which was followed by the increase in  $\beta$ -galactosidase activity. Encouraged by the reported healthy effects of *Urticaceae* plants against metabolic disturbances, we tested the protective potential of *Cecropia pachystachya* against IAPP-induced cytotoxicity using the newly designed yeast model. Although *C. pachystachya* extract exerted no beneficial effects towards the prevention of ppIAPP cytotoxicity, treatment with *C. pachystachya* enriched C-glycosyl flavonoid fraction (EFF-Cp) significantly improved viability of ppIAPP-expressing cells. Potential bioactivities of *C. pachystachya* extract and EFF-Cp towards the restoration of Ca<sup>2+</sup> homeostasis disrupted by ppIAPP expression were also assessed. Neither prevented Crz1 hyperactivation, suggesting that the EFF-Cp-induced protection against ppIAPP toxicity was mediated by Ca<sup>2+</sup>-independent mechanisms.

**Keywords:** Amylin, Calcium signaling; *Cecropia pachystachya*; Diabetes; Islet Amyloid Polypeptide (IAPP)

### **Resumo**

Apesar dos avanços na terapêutica, a diabetes tipo 2 é uma epidemia com números alarmantes a nível mundial. Novas estratégias de prevenção e tratamentos são imperativas. Um potencial alvo de investigação é a agregação do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP), um dos responsáveis pela disfunção das células- $\beta$  pancreáticas. Para estudar o impacto do IAPP na sinalização do cálcio (Ca<sup>2+</sup>), desenvolvemos um modelo de levedura com um duplo sistema de reporte que, de forma independente, expressa preproIAPP (ppIAPP) e possui o gene *lacZ* sob o controlo da região promotora do Crz1. Neste sistema, o ppIAPP induziu uma ativação exacerbada do Crz1, um fator de transcrição ativado pela via Ca<sup>2+</sup>/calmodulina/calcineurina. Com base nos efeitos medicinais descritos para plantas *Urticaceae*, testámos o potencial protetor de *Cecropia pachystachya* contra a citotoxicidade induzida pelo IAPP no modelo de levedura desenvolvido. Embora o extrato de *C. pachystachya* não tenha atenuado a toxicidade do ppIAPP, o tratamento com a fração enriquecida de *C. pachystachya* (EFF-Cp) melhorou significativamente a viabilidade celular. A bioatividade do extrato e fração de *C. pachystachya* na regulação da homeostasia do Ca<sup>2+</sup> foi também avaliada. Nenhum dos tratamentos impediu a ativação do Crz1, sugerindo que a proteção conferida pela EFF-Cp contra a toxicidade do ppIAPP é mediada por mecanismos independentes do Ca<sup>2+</sup>.

**Palavras-chave:** Amilina; *Cecropia pachystachya*; Diabetes; Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP); Sinalização do cálcio

Received / Recebido: 02/12/2021

Accepted / Aceite: 31/12/2021

Electronic Edition: www.alies.pt

## Introduction

Diabetes is the most prevalent metabolic disorder representing a major social and economic burden worldwide. Multiple factors contribute to the onset and progression of diabetes. The main pathological features of the disease include high blood glucose levels due to defective insulin sensitivity or insufficient insulin production/secretion by dysfunctional pancreatic  $\beta$ -cells (1). One undeniable contributor to  $\beta$ -cell damage in diabetes is the aggregation of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP), also called amylin, a hormone co-produced with insulin by  $\beta$ -cells in response to blood glucose levels (2). During its synthesis, immature IAPP forms are sequentially processed by hormone convertases to yield the mature and functional 37-amino acid IAPP molecule which acts synergistically with insulin to stabilize glucose homeostasis. In pre-diabetes/diabetes conditions, the boost in insulin production induced by hyperglycaemia is accompanied by an exacerbated production of IAPP. This leads to the overload of  $\beta$ -cell processing machinery and the intracellular accumulation of highly amyloidogenic immature IAPP species (3). Intracellular toxic oligomers of IAPP have been described to impair virtually all  $\beta$ -cell functions. They affect cell proliferation, increase Endoplasmic Reticulum (ER) stress, impair autophagy and mitochondrial function, dysregulate the Unfolded Protein Response (UPR), exacerbate local inflammation, among other effects (4–7). Together, these events culminate in  $\beta$ -cell injury and ultimately contribute to the disease development.

Amyloid peptides have been reported to induce  $\beta$ -cell death through apoptosis, which may be a consequence of disruption of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostasis (8-9). IAPP oligomers interfere with cellular membrane structure and dynamics, serving as the origin of ionic pores that allow the uncontrolled entry of  $\text{Ca}^{2+}$  ions into the intracellular environment, thus leading to the activation of an apoptosis cascade (10-11). Importantly, dysregulation of  $\beta$ -cell  $\text{Ca}^{2+}$  levels is associated with insulin resistance, a key feature of diabetes (12). Alterations in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  levels play a crucial role in the control of physiological insulin release from pancreatic  $\beta$ -cells. Upon glucose metabolism, ATP levels increase, inducing the inhibition of ATP-regulated potassium channels. Consequently, the plasma membrane depolarizes, producing an electrical change that opens voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. The influx of  $\text{Ca}^{2+}$  ions triggers the release of secretory granules containing insulin which are externalized by exocytosis. Altered steady-state  $\text{Ca}^{2+}$  levels have been

## Introdução

A diabetes é a doença metabólica mais prevalente, apresentando um grande impacto social e económico em todo o mundo. Tendo uma origem multifatorial, vários fatores contribuem para o desenvolvimento e progressão desta doença. A principal característica patológica da diabetes é o elevado nível de glucose no sangue como resultado da resistência à insulina e/ou produção e secreção insuficiente de insulina por parte das células- $\beta$  pancreáticas disfuncionais (1). Um dos principais contribuintes para o dano das células- $\beta$  na diabetes é a agregação do Polipéptido Amilóide dos Ilhéus (IAPP), igualmente conhecido por amilina, uma hormona co-produzida com a insulina nas células- $\beta$  em resposta aos níveis de glucose no sangue (2). Durante a sua síntese, as formas imaturas de IAPP são sequencialmente processadas por enzimas convertases até originarem uma molécula de IAPP madura e funcional, de 37 aminoácidos, que atua em sinergia com a insulina para a homeostasia da glucose. Em condições de pré-diabetes/diabetes, o aumento na produção de insulina induzido pela hiperglicemia é acompanhado por uma produção exacerbada de IAPP. Tal leva à sobrecarga da maquinaria de processamento das células- $\beta$  e à consequente acumulação intracelular de espécies imaturas de IAPP altamente amiloidogénicas (3). Várias evidências descrevem que os oligómeros intracelulares de IAPP que se formam durante este processo são as entidades tóxicas, prejudicando a maioria das funções vitais das células- $\beta$ . Entre outros fatores, afetam a proliferação celular, aumentam o stress do Retículo Endoplasmático (ER), prejudicam a autofagia e a função mitocondrial e exacerbam a inflamação local (4-7). Em conjunto, todos estes eventos culminam na lesão das células- $\beta$  e, em última instância, contribuem para o desenvolvimento da doença.

Segundo algumas evidências, os oligómeros de IAPP interferem com a estrutura e dinâmica da membrana celular, originando poros iónicos que permitem a entrada descontrolada de iões de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula, levando à ativação da cascata de apoptose (10-11). Por outro lado, a desregulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células- $\beta$  tem vindo a ser associada a características importantes da diabetes, nomeadamente, a resistência à insulina (12). Alterações nos níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  desempenham um papel crucial no controlo da secreção fisiológica de insulina pelas células- $\beta$  do pâncreas. Como resultado do metabolismo da glucose, os níveis de ATP intracelular aumentam, induzindo a inibição dos canais de potássio situados na membrana e regulados pelo ATP. Consequentemente, a membrana

observed in a wide range of cell types and tissues (e.g., platelets, cardiomyocytes,  $\beta$ -cells, muscle, kidney, liver, adipocytes, osteoblasts, among others) from Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) patients and animal models, indicating that this serves as a fundamental factor in diabetic state (12-13).

In the last decades, several studies have reported the potential of phytochemicals from natural sources to prevent or control metabolic alterations associated with chronic diseases. Some plants of the genus *Cecropia* (*Urticaceae*), native to Central and South America and known as “embaúba” in popular culture (14), are an example of this case. In particular, *Cecropia pachystachya* leaves have been widely used as hypoglycaemic, diuretic, anti-inflammatory, and antioxidant (14–19). In addition to their properties against metabolic dysfunctions, *in vivo* studies using enriched C-glycosyl flavonoid fractions and/or aqueous extracts from *C. pachystachya* leaves have shown effects within the central nervous system (20-22), whereas *in vitro*, *C. pachystachya* extracts were shown to be cytotoxic for several types of cancer cells (15-19). The pharmacological properties of *C. pachystachya* have been correlated to their content of phenolic compounds, majorly chlorogenic acid, isoorientin, orientin, isovitexin, and isoquercitrin (21-22).

In this study, we further addressed the protective action of *C. pachystachya* extracts and fractions using *Saccharomyces cerevisiae* models of IAPP-induced toxicity (23) as a potential approach to target pathological processes of diabetes.

## Materials and Methods

### *Plant material*

Aerial parts of *C. pachystachya* Trécul leaves were collected in Torres, RS, Brazil. A voucher specimen (ICN 150025) was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. The access to the Brazilian biodiversity was registered in the National System for Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) under protocol AC5A37.

plasmática sofre uma despolarização, alterando o potencial elétrico que induz a abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. O influxo de iões  $Ca^{2+}$  desencadeia a liberação de grânulos secretores, que transportam insulina, por exocitose. Alterações descontroladas nos níveis de  $Ca^{2+}$  têm sido observadas numa vasta gama de células e tecidos (por exemplo, plaquetas, cardiomiócitos, células- $\beta$ , músculo, rim, fígado, adipócitos, osteoblastos, entre outros) tanto em doentes com diabetes tipo 2, como em modelos animais (12-13).

Nas últimas décadas, diversos estudos descreveram o potencial dos fitoquímicos de origem natural na prevenção e controlo de alterações metabólicas associadas às doenças crónicas. Algumas plantas do género *Cecropia* (*Urticaceae*), nativas da América Central e do Sul e conhecidas como “embaúba” na gíria popular (14), são um exemplo desse caso. Em particular, as folhas de *Cecropia pachystachya* têm sido amplamente reportadas como tendo propriedades hipoglicémicas, diuréticas, anti-inflamatórias e antioxidantes (14–19). Além das suas propriedades contra distúrbios metabólicos, estudos *in vivo* descreveram o efeito de frações enriquecidas de C-glicosil flavonóides e/ou extratos aquosos de folhas de *C. pachystachya* também ao nível do sistema nervoso central (20-22). Por outro lado, estudos *in vitro* demonstraram que extratos de *C. pachystachya* são tóxicos para vários tipos de células cancerígenas (15-19). As propriedades farmacológicas de *C. pachystachya* foram correlacionadas com o seu conteúdo rico em compostos fenólicos, principalmente ácido clorogénico, isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercitrina (21-22).

Neste estudo, investigámos a potencial ação protetora de extratos e frações de *C. pachystachya* em modelos de *Saccharomyces cerevisiae* que recapitulam a toxicidade induzida pelo IAPP (23).

## Material e Métodos

### *Material vegetal*

Partes aéreas de folhas de *C. pachystachya* Trécul foram recolhidas em Torres, RS, Brasil. A espécie ICN 150025 foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. O acesso à biodiversidade brasileira está registado no Sistema Nacional de Gestão para o Património Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SISGEN) sob o protocolo AC5A37.

### *Aqueous extract preparation*

The leaves of *C. pachystachya* were air-dried (35–40°C) for three days and then extracted by infusion (1:10, plant/distilled water) for 30 min, filtered, freeze-dried, and stored at –20°C until use (22).

### *Enriched fractions preparation*

The enriched C-glycosyl flavonoid fraction (EFF-Cp) was obtained as previously described by Ortmann et al. (2016) (21). The dried plant material was submitted to extraction with ethanol 20% (5% plant:solvent ratio, w/v; 9500 rpm; 5 min) and the extract was partitioned with n-butanol, yielding the n-butanolic fraction. The butanolic fraction was dried under reduced pressure and stirred with Amberlite® XAD-16 resin (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA). The resin was then stirred again in the presence of methanol for 30 min, yielding the EFF-Cp.

### *Chemical characterization of extracts and fractions*

The extract was chemically analyzed by HPLC/DAD as previously described by Costa et al. (2011) (24) and Ortmann et al (2016) (21), using a Perkin Elmer Series 200 HPLC with a Photo Diode Array Detector (PDA) (PerkinElmer, Shelton, CT, USA).

### *Yeast strains and plasmids*

*S. cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1. The strain YAA5, which encodes the CDRE-*lacZ* reporter gene, was used for cell viability and  $\beta$ -galactosidase activity assays. The parental strain BY4742 and the strains YAA6 and YAA7 were used as negative controls for the  $\beta$ -galactosidase activity assays. The plasmids used are listed in Table 2. Yeast transformation procedures were carried out as indicated using the lithium acetate standard method (25).

### *Growth conditions*

Synthetic dropout (SD)-2% glucose medium was used for the growth of cells transformed with the plasmids of interest. A pre-inoculum was prepared in SD-raffinose medium, and cultures were incubated overnight at 30°C under orbital shaking. Cultures were diluted in fresh medium and incubated under the same conditions until the optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) reached log growth phase. The following equation was used to synchronize the cultures:  $OD_i \times V_i = ODF / [2(t/gt)] \times V_f$ , where  $OD_i$  is the initial optical density of the culture,  $V_i$  is the initial volume of culture,  $OD_f$  is the final optical density

### *Preparação do extrato aquoso*

As folhas de *C. pachystachya* foram secas ao ar (35–40°C) durante três dias e depois extraídas por infusão (1:10, planta/água destilada) durante 30 min. Seguidamente, foram filtradas, liofilizadas e armazenadas a -20°C até posterior uso (22).

### *Preparação das frações enriquecidas*

A fração enriquecida de C-glicosil flavonóide (EFF-Cp) foi obtida conforme descrito anteriormente por Ortmann et al. (2016) (21). O material vegetal seco foi submetido ao procedimento de extração com etanol 20% e o extrato foi fracionado com n-butanol, originando a fração n-butanólica. A fração butanólica foi seca sob pressão reduzida e agitada com a resina Amberlite® XAD-16 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Em seguida, a resina foi agitada novamente na presença de metanol por 30 min produzindo a EFF-Cp.

### *Caracterização química do extrato e frações*

O extrato foi analisado quimicamente por HPLC/DAD conforme descrito anteriormente por Costa et al. (2011) (24) e Ortmann et al (2016) (21) usando um sistema de HPLC Perkin Elmer Série 200 com um Detetor “Photo Diode Array (PDA) (PerkinElmer, Shelton, CT, EUA).

### *Estirpes de levedura e plasmídeos*

As estirpes de *S. cerevisiae* usadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. A estirpe YAA5, que codifica o gene de fusão CDRE-*lacZ*, foi usada para ensaios de viabilidade celular e avaliação da atividade da  $\beta$ -galactosidase. A estirpe parental BY4742 e as estirpes YAA6 e YAA7 foram usadas como controles negativos apenas para os ensaios de atividade da  $\beta$ -galactosidase. Os plasmídeos usados estão listados na Tabela 2. O protocolo de transformação das leveduras foi realizado segundo o método de acetato de lítio (25).

### *Condições de crescimento*

Meio sintético com 2% de glucose foi usado para o crescimento de células transformadas com os plasmídeos de interesse. Um pré-inóculo foi preparado em meio sintético com rafinose e as culturas foram incubadas durante a noite a 30°C sob agitação orbital. As culturas foram diluídas em meio fresco e incubadas nas mesmas condições até que a densidade ótica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) atingisse a fase de crescimento logarítmico. A seguinte equação foi usada para sincronizar as culturas:  $OD_i \times V_i = ODF / [2(t/gt)] \times V_f$ , onde  $OD_i$  é a densidade

of the culture,  $t$  is the time,  $gt$  is the generation time of the strain, and  $V_f$  is the final volume of culture. Cell cultures were diluted as indicated for each assay. In all experiments, induction of IAPP expression was carried out in SD-galactose medium. Media composition is detailed in Raimundo *et al.* (2020) (23).

#### Flow cytometry

Cell cultures were diluted to  $OD_{600} = 0.1 \pm 0.01$  in SD-galactose and incubated with 0, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  of EFF-Cp or *C. pachystachya* aqueous extract, at 30°C for 20 h under orbital agitation. Cells were incubated with propidium iodide (PI) (Merck, Darmstadt, DE) at a final concentration of 2.5  $\mu\text{g/mL}$  for 30 min at 30°C under orbital agitation and protected from light. Flow cytometry was performed using a BD FACS Calibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data acquisition and analysis were performed using CellQuest® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and FlowJo® software (Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA), respectively. A minimum of 50000 events were collected for each experiment. Cell doublets exclusion was performed based on Forward-A and -W scatter parameters.

#### $\beta$ -galactosidase activity

The  $\beta$ -galactosidase assays to infer  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis were carried out as described by Garcia *et al.* (2016) (26). Briefly, cultures at  $OD_{600} = 0.5 \pm 0.05$  were diluted in SD-galactose medium to  $OD_{600} = 0.1 \pm 0.01$ , transferred to a 96-well microplate and incubated with 0 and 50  $\mu\text{g/mL}$  of EFF-Cp or *C. pachystachya* aqueous extract for 20 h at 30°C under orbital agitation. After this period,  $OD_{600}$  of cultures were measured by the transfer of 10  $\mu\text{L}$  of cell suspensions to a new 96-well plate followed by addition of 20  $\mu\text{L}$  Y-PER cell lysis reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.–Life Technologies, USA). The plate was incubated for 20 min at 37°C without agitation. 240  $\mu\text{L}$  of *lacZ* buffer [8.5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE), 5.5 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, DE), 0.75 g/L KCl (Panreac, Bracelona, ES), 0.246 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, DE) containing 4 mg/L *o*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA)] was added to each well, and the plate was incubated at 30°C for 2 h. The results were expressed as Miller units (26), applying the following equation, where  $V$ =volume of culture assayed in mL and  $t$ =reaction time in minutes:

ótica inicial da cultura,  $V_i$  é o volume inicial da cultura,  $OD_f$  é a densidade ótica final da cultura,  $t$  é o tempo,  $gt$  é o tempo de geração da estirpe e  $V_f$  é o volume final da cultura. As culturas de células foram diluídas conforme indicado para cada ensaio. Em todas as experiências, a indução da expressão do IAPP foi realizada em meio sintético com galactose. A composição de todos os meios encontra-se detalhada em Raimundo *et al.* (2020) (23).

#### Citometria de fluxo

As culturas de células foram diluídas para uma  $OD_{600}$  de  $0,1 \pm 0,01$  em meio sintético com galactose e incubadas com 0, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de EFF-Cp ou extrato aquoso de *C. pachystachya*, a 30°C durante 20 h sob agitação orbital. As células foram incubadas com iodeto de propídio (PI) (Merck, Darmstadt, DE) numa concentração final de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  durante 30 min, a 30°C sob agitação orbital e protegidas da luz. A citometria de fluxo foi realizada usando um citômetro de fluxo BD FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A aquisição e análise de dados foram realizadas com os programas CellQuest® ((BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e FlowJo® (Tree Star Inc., San Carlos, CA, EUA), respetivamente. Um mínimo de 50000 eventos foi analisado por cada experiência. A exclusão de dupletos celulares foi realizada com base na dispersão dos parâmetros “Forward”-A e -W.

#### Atividade da $\beta$ -galactosidase

Os ensaios da  $\beta$ -galactosidase para inferir a homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  foram realizados conforme descrito por Garcia *et al.* (2106) (26). Resumidamente, as culturas com uma  $OD_{600} = 0,5 \pm 0,05$  foram diluídas em meio sintético com galactose para uma  $OD_{600} = 0,1 \pm 0,01$ . De seguida, foram transferidas para uma microplaca de 96 poços e incubadas com 0 ou 50  $\mu\text{g/mL}$  de EFF-Cp ou extrato aquoso de *C. pachystachya*, durante 20 h a 30°C sob agitação orbital. Após este período, a  $OD_{600}$  das culturas foi medida, 10  $\mu\text{L}$  de cada suspensão de células foram transferidos para uma nova placa de 96 poços seguido pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de reagente de lise celular Y-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.–Life Technologies, EUA). A placa foi incubada durante 20 min a 37°C sem agitação. 240  $\mu\text{L}$  de tampão *lacZ* [8,5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE), 5,5 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, DE), 0,75 g/L KCl (Panreac, Bracelona, ES), 0,246 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, DE) contendo 4 mg/L *o*-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) (Sigma-Aldrich®)] foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada a 30°C por 2 h. Os resultados foram

$$\text{Miller units} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

### Statistical Analysis

Statistical analysis was expressed using Graphpad Prism 8 software. Data are mean  $\pm$  SD of at least three independent biological replicates. One-way ANOVA with Dunnet's multiple comparison test was performed to assess differences between the conditions. The *t*-test was used to access differences between the untreated p426 and ppIAPP-GFP conditions in the flow cytometry analysis. Two-way ANOVA with the Tukey's or Sidak's multiple comparison test was performed to access differences between the  $\beta$ -galactosidase assay conditions.

## Results and Discussion

### *Development of a yeast model to address the effects of ppIAPP on Ca<sup>2+</sup> signaling*

Insulin secretion,  $\beta$ -cell survival, proliferation, and function are tightly controlled by Ca<sup>2+</sup> dynamics. To determine the deleterious effect of IAPP on Ca<sup>2+</sup> signaling, we took advantage of a previously described strategy we designed to recapitulate the molecular pathways of IAPP aggregation in the model organism *Saccharomyces cerevisiae* (23).

For this, we used the reporter strain YAA5 encoding the *lacZ* gene under the control of Crz1-recognition elements (Table 1), which is sensitive to Ca<sup>2+</sup> intracellular levels, as the yeast transcription factor Crz1 is regulated by the calmodulin CaM/calcineurin (CaN) pathway (27). In a similar mechanism to the human orthologue NFAT, Crz1 activation is regulated by Ca<sup>2+</sup> cytosolic concentrations. Slight oscillations in Ca<sup>2+</sup> levels trigger CaM/CaN activation leading to Crz1 dephosphorylation, nuclear translocation, and stimulation of calcineurin-dependent response element (CDRE)-driven gene expression. Thus, the degree of Crz1 activation can be monitored through the measurement of  $\beta$ -galactosidase activity. The strains YAA6 and YAA7, devoid of *CRZ1* and *CNBI* (encoding the regulatory subunit of CaN complex), respectively, are used as control strains (Table 1).

expressos como unidades de Miller (26), aplicando-se a seguinte equação, onde V = volume da cultura testada em mL e t = tempo de reação em minutos:

$$\text{Unidades de Miller} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550})}{(t \times V \times \text{OD}_{600})}$$

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa Graphpad Prism 8. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três réplicas biológicas independentes. A análise ANOVA unilateral com o teste de comparação múltipla de Dunnet foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições. O teste *t* foi usado para aferir as diferenças entre as condições p426 e ppIAPP-GFP não tratadas na análise de citometria de fluxo. A análise ANOVA bilateral com o teste de comparação múltipla de Tukey ou Sidak foi realizada para avaliar as diferenças entre as condições nos ensaios da  $\beta$ -galactosidase.

## Resultados e Discussão

### *Desenvolvimento de um modelo de levedura para avaliar os efeitos do ppIAPP na sinalização do Ca<sup>2+</sup>*

A secreção de insulina, sobrevivência, proliferação e função das células- $\beta$  são controladas pela dinâmica do Ca<sup>2+</sup>. Para determinar o efeito do IAPP na sinalização do Ca<sup>2+</sup>, recorreremos a uma estratégia previamente descrita para recapitular as vias moleculares de agregação do IAPP no organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* (23).

Para tal, utilizamos a estirpe YAA5 que codifica o gene *lacZ* sob o controle de elementos de reconhecimento do Crz1 (Tabela 1), o fator de transcrição de levedura que é regulado pela via calmodulina (CaM)/calcineurina (CaN) (27) e que, portanto, é sensível aos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. Através de um mecanismo semelhante ao seu ortólogo humano NFAT, a ativação do Crz1 é regulada pelas concentrações citosólicas de Ca<sup>2+</sup>. Ligeiras oscilações nos níveis deste ião desencadeiam a ativação da CaM/CaN levando à desfosforilação do Crz1, translocação nuclear e estimulação da expressão de genes que se encontrem a jusante da região promotora do Crz1. Com base nesta via, o grau de ativação do Crz1 pode assim ser monitorizado através da atividade da  $\beta$ -galactosidase. As estirpes YAA6 e YAA7, cujos genes *CRZ1* e *CNBI* (que codificam a subunidade reguladora do complexo CaN) foram deletados, respetivamente, foram usadas como estirpes de controlo (Tabela 1).

**Table 1** - *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study**Tabela 1** - Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* usadas neste estudo.

Strain / Estirpe	Genotyping Information / Informação Genotípica	Reference / Referência
<b>BY4742</b>	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3</i>	EUROSCARF*
<b>YAA5</b>	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ</i>	(Araki et al., 2009)
<b>YAA6</b>	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 YNL027W::HIS3MX4 aur1:: AUR1-C-4xCDRE-lacZ</i>	(Araki et al., 2009)
<b>YAA7</b>	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 YKL190W::kanMX4 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ</i>	(Araki et al., 2009)
<b>YAA5_ppIAPP-GFP</b>	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ &lt; p426-ppIAPP_GFP &gt;</i>	This study / Este estudo
<b>YAA6_ppIAPP-GFP</b>	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 YNL027W::HIS3MX4 aur1:: AUR1-C-4xCDRE-lacZ &lt; p426-ppIAPP_GFP &gt;</i>	This study / Este estudo
<b>YAA7_ppIAPP-GFP</b>	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 YKL190W::kanMX4 aur1::AUR1-C-4xCDRE-lacZ &lt; p426-ppIAPP_GFP &gt;</i>	This study / Este estudo

\*EUROpean Archive for Functional analysis

**Table 2** - Plasmids used in this study**Tabela 2** -Plasmídeos usados neste estudo.

Plasmid / Plasmídeo	Description / Descrição	Reference / Referência
<b>p426*</b>	<i>GAL1<sub>promoter</sub>, 2μ, URA</i>	ATCC 87341 <sup>TM**</sup>
<b>p426-ppIAPP_GFP</b>	<i>GAL1<sub>promoter</sub>, ppIAPP_GFP, 2μ, URA</i>	Raimundo et al, 2020

\*Empty plasmid used as control / Plasmídeo vazio usado como controlo

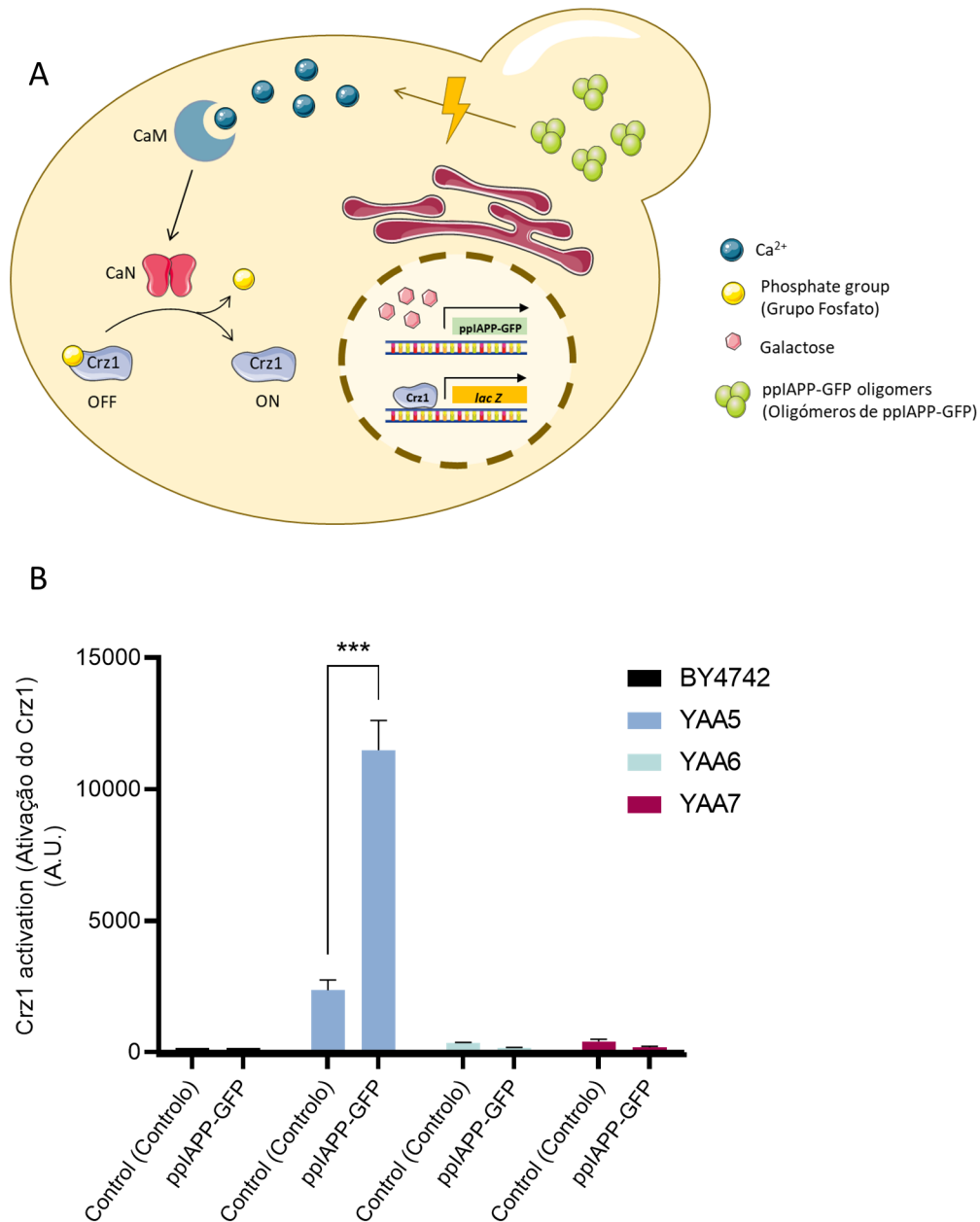
\*\*American Type Culture Collection

The novel yeast models YAA5\_ppIAPP-GFP, YAA6\_ppIAPP-GFP and YAA7\_ppIAPP-GFP consisted of YAA5, YAA6 and YAA7 strains, respectively, engineered to encode the most immature and toxic form of human IAPP (preproIAPP, ppIAPP) fused to the green fluorescent protein (GFP) and under the transcriptional control of a *GAL1*-inducible promoter (Figure 1A). As previously described by Raimundo et al. (2020) (23), the expression of such construct induces stronger toxic effects on yeast growth and cell viability than fusions of partially and fully processed forms of IAPP. For this reason, proIAPP-GFP and mature IAPP-GFP constructs were not included in the present study.

The expression of ppIAPP-GFP induced a strong activation of the CaM/CaN pathway in the YAA5 strain as indicated by the increase of Crz1-dependent β-galactosidase activity (Figure 1B). This is consistent with the reported effects of amyloid peptide on the

Os novos modelos de levedura YAA5\_ppIAPP-GFP, YAA6\_ppIAPP-GFP e YAA7\_ppIAPP-GFP representam as estirpes YAA5, YAA6 e YAA7, respetivamente, geneticamente modificadas para codificar a forma mais imatura e tóxica do IAPP (pré-pro-IAPP, ppIAPP) fundida com a proteína verde fluorescente (GFP) sob o controlo transcricional do promotor indutível *GAL1* (Figura 1A). Conforme descrito anteriormente por Raimundo et al. (2020) (23), no modelo de levedura desenvolvido, a expressão desta construção induz uma maior toxicidade ao nível do crescimento e viabilidade celular comparativamente às fusões que possuem as formas parcial ou totalmente processadas de IAPP. Por esse motivo, no presente estudo, decidimos não incluir fusões de proIAPP-GFP e IAPP-GFP.

A expressão do ppIAPP-GFP induziu uma forte ativação da via CaM/CaN na estirpe YAA5, conforme indicado



**Figure 1** - Novel yeast model to address the effects of ppIAPP on Ca<sup>2+</sup> signaling. (A) Schematic representation of the model. (B) Expression of ppIAPP-GFP fusion in YAA5 yeast model induces Crz1 hyperactivation. Cells expressing ppIAPP-GFP and the respective control were induced for 20 h with galactose. Crz1 activation was assessed by monitoring  $\beta$ -galactosidase activity. The values represent mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments. The YAA5 strain encodes the construct *aur1::AURI-C-4xCDRE-lacZ*. YAA6, YAA7 are isogenic to YAA5 devoid of *CRZ1* and *CNB1* genes, respectively. Statistical differences are denoted as \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figura 1** - Novo modelo de levedura para avaliar os efeitos do ppIAPP na sinalização de Ca<sup>2+</sup>. (A) Representação esquemática do modelo. (B) A expressão da fusão ppIAPP-GFP no modelo de levedura YAA5 induz a hiperativação do Crz1. Células que expressam ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidos durante 20 h com galactose. A ativação do Crz1 foi avaliada monitorizando a atividade da  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. A estirpe YAA5 codifica a construção *aur1::AURI-C-4xCDRE-lacZ*. As estirpes YAA6 e YAA7 são isogénicas à YAA5, com a deleção dos genes *CRZ1* e *CNB1*, respectivamente. As diferenças estatísticas são identificadas como \*\*\*  $p < 0,001$ .



disruption of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and dysregulated increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels. By comparison, only a residual activity was observed in YAA6 and YAA7 cells. Likewise, in the parental strain BY4742 devoid of the CDRE-*lacZ* reporter construct,  $\beta$ -galactosidase activity was nearly undetectable (Figure 1B). These findings postulate our yeast model as a powerful platform for the bioprospection of compounds with potential to inhibit ppIAPP-induced Crz1 hyperactivation.

#### *Chemical characterization of Cecropia pachystachya extract and fraction*

The chromatographic profiles of *C. pachystachya* extract and fraction were similar to those described by Gazal et al. (2014) (22) as confirmed by quality control analysis indicating the presence of similar concentrations of major compounds present in the extract and fraction, namely chlorogenic acid, isoorientin, orientin, isovitexin and isoquercitrin (data not shown).

#### *Cecropia pachystachya EFF-Cp fraction protects YAA5 yeast cells against ppIAPP-induced toxicity*

The protective potential of phytochemicals from natural sources has been widely explored as alternative approaches against the metabolic alterations observed in many chronic diseases. More specifically, *C. pachystachya* bioactivity has been associated with the promotion of metabolic health by mechanisms including the regulation of glycaemic control, inflammation, and oxidative stress (14–17, 19).

*S. cerevisiae* is considered a robust primary drug-screening tool to filter for compounds with cytoprotective activity for further validation in more complex models (28–30). Among other features, this is possible because *S. cerevisiae* shares highly conserved molecular and cellular mechanisms with human counterparts.

The reporter strain YAA5\_ppIAPP-GFP was used to investigate further the potential protective action of *C. pachystachya* towards IAPP-induced cytotoxicity. ppIAPP-GFP expression was confirmed by flow cytometry, showing that nearly 30% of the total cell population displayed GFP signals in the control condition (Figure 2A, 2B). Interestingly, incubation with EFF-Cp induced a dose-dependent reduction in the percentage of GFP positive cell population in ppIAPP-

pelo aumento da atividade da  $\beta$ -galactosidase (Figura 1B). Tal resultado é consistente com os estudos que reportam os efeitos dos péptidos amilóides na disrupção da homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  e aumento desregulado nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Por comparação, em células YAA6 e YAA7 apenas uma atividade residual do Crz1 foi observada. Da mesma forma, na estirpe parental BY4742 desprovida da construção CDRE-*lacZ*, a atividade da  $\beta$ -galactosidase foi quase indetetável (Figura 1B). Estes dados confirmam o nosso modelo de levedura como uma plataforma robusta para a bioprospecção de compostos com potencial para inibir a ativação exacerbada do Crz1 induzida pelo ppIAPP.

#### *Caracterização química do extrato e fração de Cecropia pachystachya*

Os perfis cromatográficos do extrato e fração de *C. pachystachya* foram semelhantes aos descritos por Gazal et al. (2014) (22), indicando a presença de concentrações semelhantes dos compostos principais, nomeadamente, ácido clorogénico, isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercitrina (dados não mostrados).

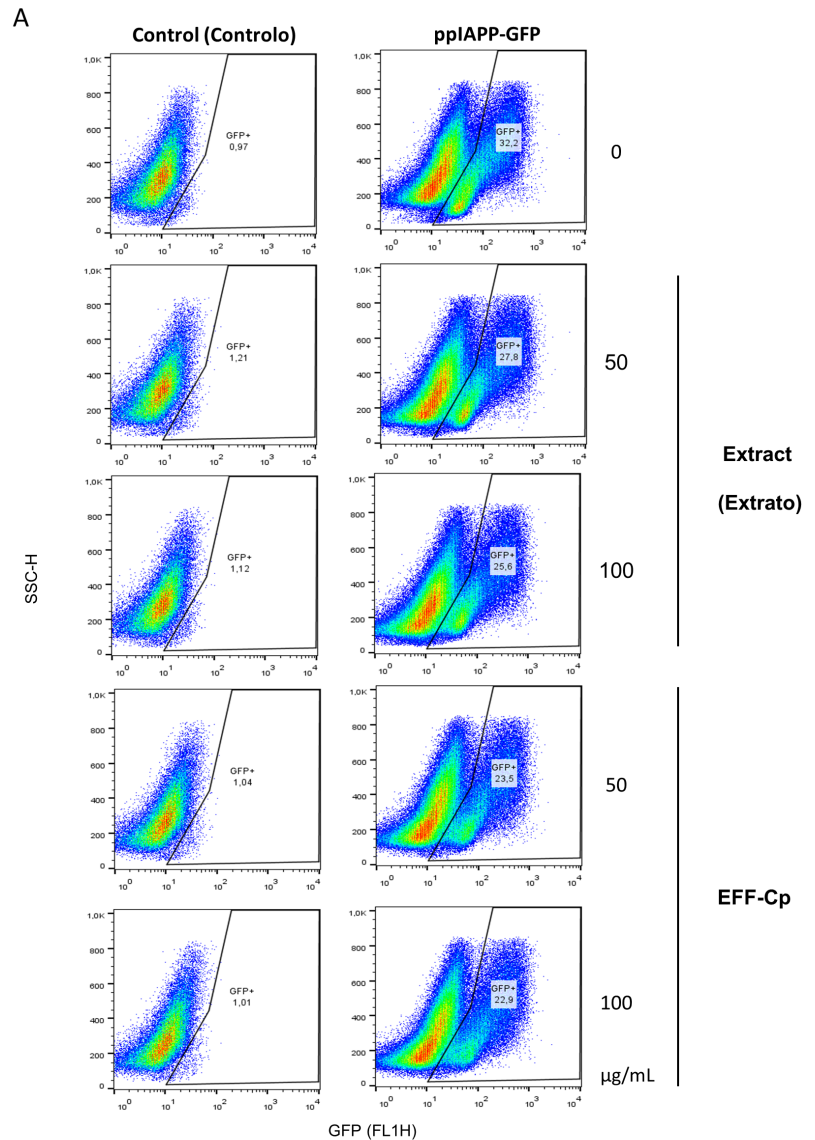
#### *A fração de Cecropia pachystachya (EFF-Cp) protege as células YAA5 contra a toxicidade induzida pelo ppIAPP*

O potencial protetor dos fitoquímicos provenientes de fontes naturais tem sido amplamente explorado como uma abordagem alternativa no combate a alterações metabólicas observadas em diversas doenças crónicas. Mais especificamente, a bioatividade de *C. pachystachya* foi associada à promoção da saúde metabólica por mecanismos que incluem a regulação do controlo glicémico, inflamação e stress oxidativo (14-17, 19).

A levedura *S. cerevisiae* tem sido considerada uma plataforma robusta para o rastreio inicial de compostos com atividade citoprotetora que, posteriormente, são validados em modelos mais complexos (28-30). Entre outras características, tal é possível porque a *S. cerevisiae* compartilha mecanismos moleculares e celulares altamente conservados com os seus homólogos humanos.

Neste estudo, a estirpe YAA5\_ppIAPP-GFP foi usada para investigar a potencial ação protetora de *C. pachystachya* em relação à citotoxicidade induzida pelo IAPP. Primeiramente, a expressão de ppIAPP-GFP foi confirmada por citometria de fluxo, mostrando que quase 30% da população total de células possui sinal de GFP na condição controlo (Figura 2A, 2B).

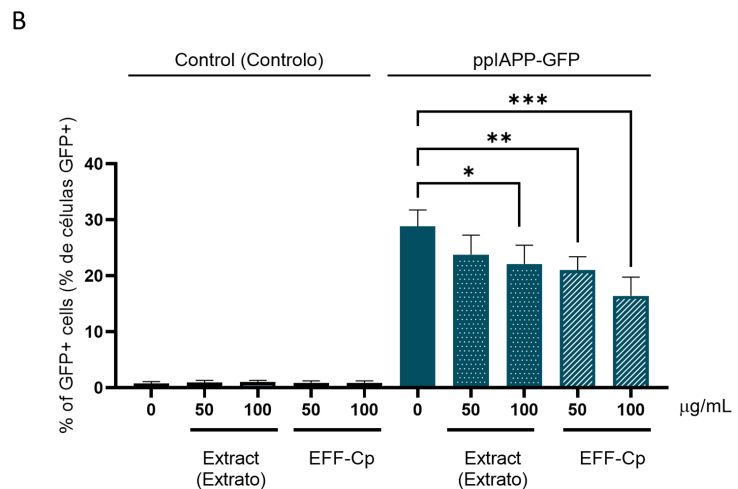
**Figure 2** - Treatment with *Cecropia pachystachya* EFF-Cp fraction reduces the expression of ppIAPP-GFP. YAA5 cells expressing ppIAPP-GFP and the respective control were induced for 20 h with galactose and co-treated with *C. pachystachya* extract or the EFF-Cp fraction at a concentration of 0, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . GFP cells were assessed by flow cytometry. (A) Representative clouds of GFP positive cell population are shown for each condition. (B) Frequency of GFP positive cells in treated P426 and ppIAPP-GFP expressing yeast. The values represent mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments. Statistical differences are denoted as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 2** - O tratamento com a fração de *Cecropia pachystachya* (EFF-Cp) reduz a expressão de ppIAPP-GFP. Células YAA5\_ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidos durante 20 h com galactose e co-tratadas com o extrato de *C. pachystachya* ou a fração nas concentrações de 0, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As células positivas para GFP foram avaliadas por citometria de fluxo.

(A) Nuvens representativas da população de células positivas para GFP em cada condição.

(B) Frequência de células positivas para GFP em leveduras tratadas que expressam as construções P426 e ppIAPP-GFP. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são identificadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

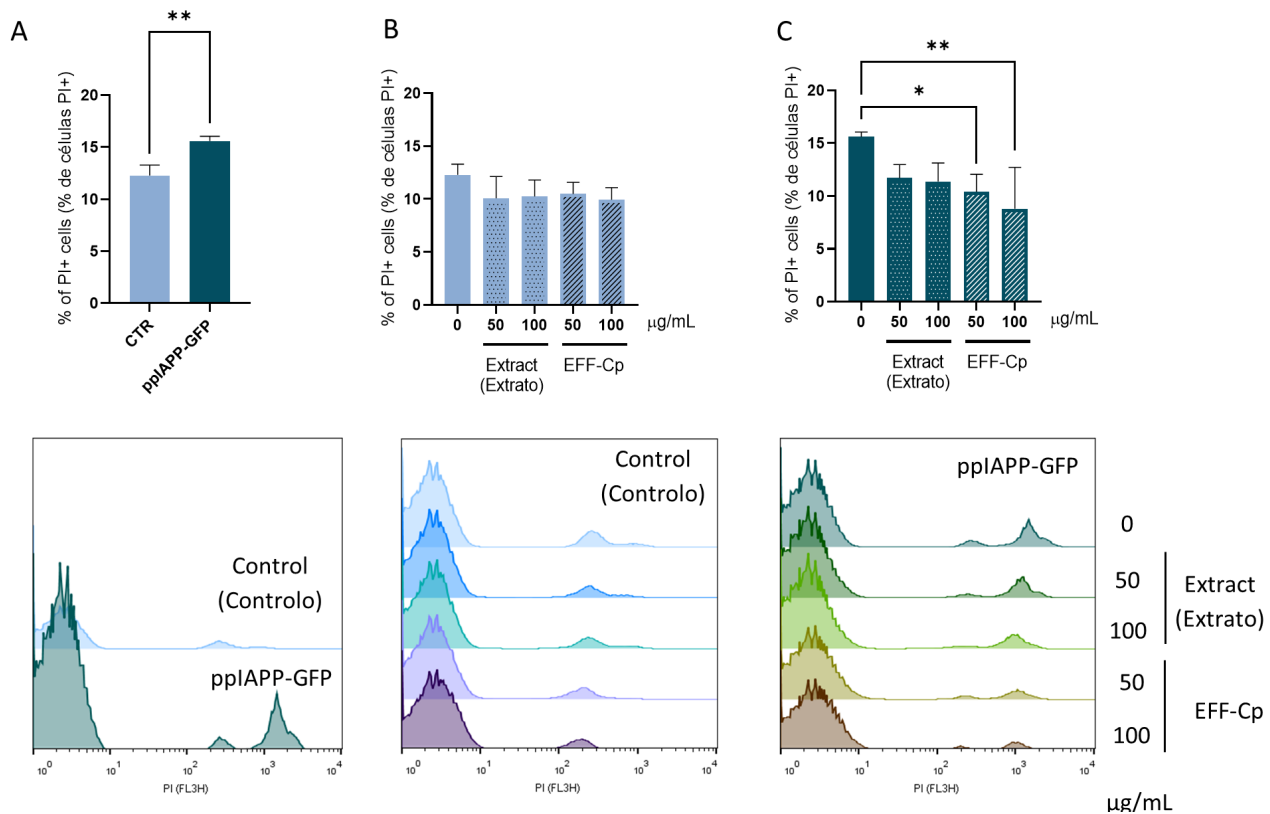


GFP expressing yeast. However, further studies are needed to fully address the impact of EFF-Cp treatment on the expression ppIAPP-GFP fusion peptide.

Next, membrane integrity was determined using PI staining as a measure of cell viability. The ppIAPP-GFP construct induced toxicity after 20 h incubation in the presence of galactose (Figure 3A). *C. pachystachya* extract and EFF-Cp did not affect cell viability in control

Curiosamente, a incubação com a EFF-Cp induziu uma redução dependente da dose na percentagem da população de células positivas para GFP nas leveduras que expressam o ppIAPP-GFP. No entanto, mais estudos serão necessários para desvendar o real impacto do tratamento com a EFF-Cp na expressão do péptido de fusão ppIAPP-GFP.

De seguida, a integridade da membrana foi determinada usando a marcação de PI como medida para inferir a viabilidade celular. A construção ppIAPP-GFP induziu toxicidade após 20 h de incubação na presença de galactose (Figura 3A). Relativamente ao tratamento,



**Figure 3** - EFF-Cp treatment ameliorates cytotoxicity induced by ppIAPP-GFP expression in YAA5 yeast cells. YAA5 cells expressing ppIAPP-GFP fusion and the respective control were induced for 20h with galactose and co-treated with EFF-Cp or *C. pachystachya* extract at a concentration of 0, 50 and 100 µg/mL. (A) The frequency of propidium iodide (PI) positive cells assessed by flow cytometry in untreated yeast. (B) Frequency of PI positive cells in treated p426 and (C) ppIAPP-GFP expressing yeast. Representative PI negative and positive cells histograms are shown for each condition. The values represent mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments. Statistical differences are denoted as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

**Figura 3** - O tratamento com a fração (EFF-Cp) melhora a citotoxicidade induzida pela expressão de ppIAPP-GFP nas células YAA5. Células YAA5 que expressam o ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidos durante 20h com galactose e co-tratadas com EFF-Cp ou extrato de *C. pachystachya* a uma concentração de 0, 50 e 100 µg / mL. (A) Frequência de células positivas para iodeto de propídio (PI) avaliada por citometria de fluxo em leveduras não tratadas. (B) Frequência de células positivas para PI em leveduras tratadas que expressam a construção p426 e (C) ppIAPP-GFP. Os histogramas representativos de células positivas e negativas para PI são mostrados para cada condição. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. As diferenças estatísticas são identificadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

cells (Figure 3B). Remarkably, EFF-Cp treatment significantly reduced the toxic effects mediated by ppIAPP-GFP with concentrations of 50 and 100 µg/mL, which can be deduced from the decrease of PI positive cells to values similar to the control condition (Figure 3C).

The protective action exerted by EFF-Cp may be attributed, at least in part, to chlorogenic acid and isoorientin, the major compounds identified in EFF-Cp. Both compounds have been previously associated with protective actions against diabetes. Concerning IAPP pathology, chlorogenic acid was shown to exert an inhibitory effect on human IAPP (hIAPP) oligomerization/fibril formation and to improve cell viability in pancreatic INS-1 cells exposed to hIAPP aggregates. By delaying the onset of secondary structure conversion of hIAPP from random coil to  $\beta$ -structure, it redirects the amyloidogenic molecules into off-pathway intermediates that are less toxic to the cells (31). Chlorogenic acid was also shown to decrease fasting blood glucose, lipid peroxidation (LPO) products, and glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), and to increase plasma insulin, total hemoglobin, C-peptide, and glycogen in streptozotocin/nicotinamide (STZ/NA)-induced type 2 diabetic rats (32-33). It is currently argued that the hypoglycemic mechanisms of chlorogenic acid may be related to the inhibition of the glucose-6-phosphate-shifting enzyme, regulating the blood glucose balance *in vivo*. In addition, studies have shown that chlorogenic acid can activate AMP-activated protein kinase (AMPK), upregulate the gene expression of glucose transporter 4 (GLUT4) to stimulate the absorption of glucose in skeletal muscle, downregulate expression of glucose-6-phosphate-shifting enzyme, inhibit gluconeogenesis, and reduce fatty acids synthesis (34). In the liver, chlorogenic acid activity was also associated with reduced oxidative and ER stress, increased autophagy and improved mitochondrial activity (35). In a similar way, the major flavonoid compounds in EFF-Cp, orientin and its isomer isoorientin, have also been reported as potent regulators of oxidative stress. In addition, isoorientin may act to improve insulin sensitivity and limit lipid accumulation in diabetic animals and cultured adipocytes (36). Therefore, it is plausible to consider that protection conferred by EFF-Cp in our model system may be attributed to the concerted action of two main molecular events: (a) modulation of toxic IAPP aggregation and (b) mitigation of IAPP-induced redox imbalance.

o extrato de *C. pachystachya* e EFF-Cp não afetaram a viabilidade celular nas leveduras controle (Figura 3B). Porém, o tratamento com EFF-Cp reduziu significativamente os efeitos tóxicos mediados pelo ppIAPP-GFP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, o que foi deduzido pela diminuição da porcentagem de células positivas para PI para valores semelhantes à condição controle (Figura 3C).

A ação protetora exercida pela EFF-Cp pode estar associada, pelo menos em parte, ao ácido clorogénico e à isoorientina, dois dos principais compostos identificados nesta fração e que já foram anteriormente associados a ações protetoras contra a diabetes. Relativamente à patologia do IAPP, o ácido clorogénico demonstrou inibir a oligomerização/formação de fibrilas de IAPP humano (hIAPP) e melhorar a viabilidade celular em células pancreáticas expostas a agregados de hIAPP. Ao atrasar a conversão da estrutura secundária do hIAPP para a estrutura  $\beta$ , o ácido clorogénico redireciona as moléculas amiloidogénicas para intermediários que são menos tóxicos para as células (31). Além disso, num modelo de ratos com diabetes tipo 2, este composto também demonstrou diminuir a glucose no sangue em situações de jejum, reduzir os níveis de produtos de peroxidação lipídica (LPO) e hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>), bem como aumentar os níveis de insulina plasmática, hemoglobina total, péptido-C e glicogénio (32-33). Atualmente, argumenta-se que os efeitos hipoglicémicos do ácido clorogénico podem estar relacionados com a inibição da glucose-6-fosfato desidrogenase, regulando o equilíbrio da glucose no sangue *in vivo*. Além disso, estudos têm demonstrado que o ácido clorogénico pode ainda ativar a proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK), estimular a absorção de glucose no músculo esquelético, inibir a gluconeogénese e reduzir a síntese de ácidos gordos (34). No fígado, a atividade do ácido clorogénico também tem sido associada à redução do stress oxidativo, stress do reticulo endoplasmático, aumento da autofagia e melhoria da atividade mitocondrial (35). De modo semelhante, os principais compostos flavonóides da EFF-Cp, nomeadamente a orientina e seu isómero isoorientina, também foram descritos como potentes reguladores do stress oxidativo. Além disso, a isoorientina atua melhorando a sensibilidade à insulina e limitando a acumulação de lipídios tanto em animais diabéticos como em adipócitos presentes em cultura (36). Posto isto, é plausível considerar que a proteção conferida pela EFF-Cp no modelo de levedura aqui apresentado pode ser atribuída à ação combinada de dois grandes eventos moleculares: (a) modulação da agregação tóxica do IAPP e (b) mitigação do desequilíbrio redox induzido pelo IAPP.

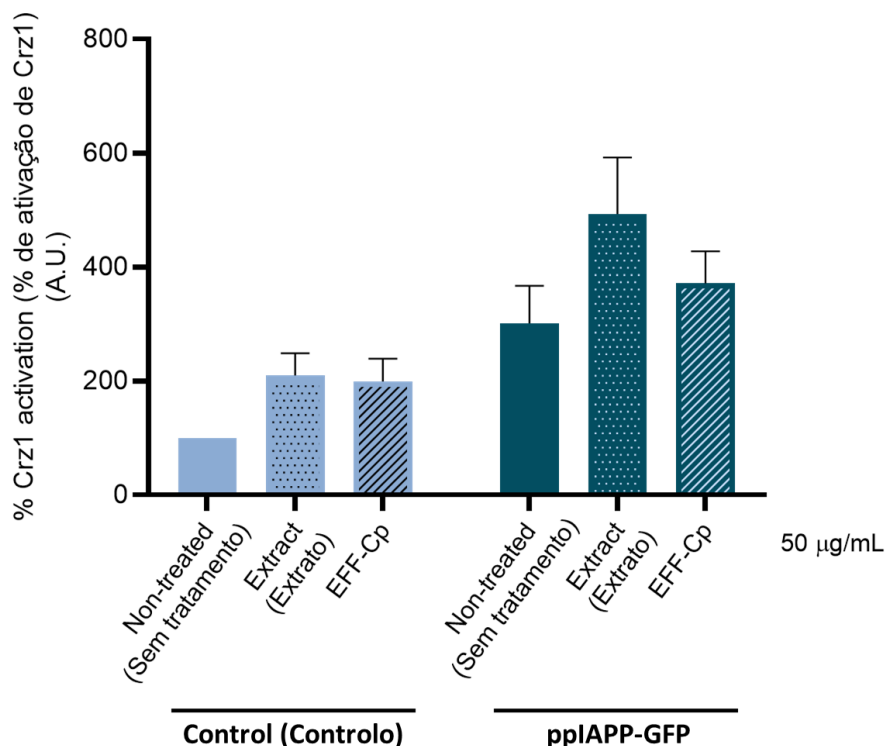
*Cecropia pachystachya* bioactivity is unrelated to  $Ca^{2+}$  signalling / Bioatividade de *Cecropia pachystachya* não está relacionada com a via de sinalização do  $Ca^{2+}$

The cytosolic  $Ca^{2+}$  levels regulate a broad number of cellular processes, including metabolism, proliferation, transcription, and secretion. In  $\beta$ -cells, insulin granule exocytosis is tightly controlled by a finely tuned balance between  $Ca^{2+}$  influx and efflux pathways. Alterations in  $Ca^{2+}$  dynamics have been associated with impaired insulin secretion and  $\beta$ -cell dysfunction (37), thus representing an interesting target for a therapeutic approach.

Although there is no reported correlation between *Cecropia pachystachya* bioactivity and  $Ca^{2+}$  signalling, chlorogenic acid (one of the major components of EFF-Cp) was shown to suppress the dysregulated  $Ca^{2+}$  influx from endoplasmic reticulum and extracellular environment in endothelial cells exposed to a toxic phospholipid (38).

Os níveis citosólicos de  $Ca^{2+}$  regulam um amplo número de processos celulares, incluindo o metabolismo, proliferação, transcrição e secreção. Nas células- $\beta$ , a exocitose dos grânulos de insulina é rigidamente controlada por um equilíbrio bem ajustado entre as vias de influxo e efluxo de  $Ca^{2+}$ . Alterações na dinâmica do  $Ca^{2+}$  têm sido associadas à secreção deficiente de insulina e disfunção das células- $\beta$  (37), representando assim um alvo interessante para uma abordagem terapêutica.

Embora não haja nenhuma correlação evidente entre a bioatividade de *Cecropia pachystachya* e a via de sinalização do  $Ca^{2+}$ , o ácido clorogénico (um dos principais componentes da EFF-Cp) foi descrito como sendo capaz de suprimir o influxo desregulado de  $Ca^{2+}$  proveniente do retículo endoplasmático e do ambiente extracelular em células endoteliais expostas a um fosfolípido tóxico (38).



**Figure 4** - Treatment with *Cecropia pachystachya* extract and EFF-Cp fraction does not attenuate ppIAPP-GFP-induced  $Ca^{2+}$  homeostasis impairment. YAA5 cells expressing ppIAPP-GFP and the respective control were induced for 20 h with galactose and co-treated with *C. pachystachya* extract or EFF-Cp at a concentration of 50  $\mu$ g/mL. Crz1 activation was assessed by monitoring  $\beta$ -galactosidase activity. The values represent mean  $\pm$  SD from at least three independent experiments. No statistical significances were found.

**Figura 4** - O tratamento com o extrato de *Cecropia pachystachya* e fração EFF-Cp não atenua o comprometimento da homeostasia do  $Ca^{2+}$  induzido pelo ppIAPP-GFP. Células ppIAPP-GFP e o respetivo controlo foram induzidas durante 20 h com galactose e co-tratadas com extrato de *C. pachystachya* ou EFF-Cp a uma concentração de 50  $\mu$ g/mL. A ativação do Crz1 foi avaliada monitorizando a atividade da  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. Não foram encontradas significâncias estatísticas.

Taking advantage of the developed yeast-based reporter assay, we used YAA5 cells expressing control and ppIAPP-GFP constructs as “*in vivo* test-tubes” to screen the bioactivity of *C. pachystachya* extract and EFF-Cp towards the modulation of Ca<sup>2+</sup> signalling and consequent Crz1 activation. Since treatment with the lower concentration (50 µg/mL) of EFF-Cp significantly protected cells against ppIAPP-GFP toxicity, we selected this concentration for further tests. The incubation of YAA5\_ppIAPP-GFP cells with *C. pachystachya* extract did not affect β-galactosidase activity (Figure 4), which is in accordance with its ineffectiveness to protect cells against ppIAPP-GFP-induced toxicity in the viability assay. Similarly, in ppIAPP-GFP expressing cells, no alterations on Crz1 activation were observed after treatment with EFF-Cp. Since EFF-Cp is not able to inhibit Crz1 hyperactivation, we hypothesize that it might be conferring protection against deleterious effects of ppIAPP by modulating alternative molecular mechanisms that do not include CaM/CaN pathway. Additional studies are needed to fully comprehend the molecular and cellular mode of action underlying EFF-Cp protective effect.

## Conclusions

With the development of a ppIAPP-expressing yeast model that acts as a sensor of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels, our study provided new insights about the interference of ppIAPP on Ca<sup>2+</sup> signaling. Overexpression of ppIAPP induced the hyperactivation of Crz1 activity, which allowed us to identify Ca<sup>2+</sup> signaling dysregulation as one of the pathological mechanisms underlying ppIAPP cytotoxicity. Importantly, such findings also offered a valuable high-throughput yeast-based reporter assay to screen for compounds preventing the deleterious effects of ppIAPP on Ca<sup>2+</sup> dysregulation. Our study shows that the effectiveness of EFF-Cp to improve cell viability was not mediated by changes in Ca<sup>2+</sup> signaling, suggesting that other mechanisms might be associated with this protective response. Noteworthy, EFF-Cp chemical composition is enriched in chlorogenic acid and isoorientin, two secondary metabolites exerting known protective properties towards diabetic complications and IAPP pathological effects. Based on the reported evidence, it seems plausible to hypothesize that cellular protection mediated by EFF-Cp may include the mitigation of oxidative stress, ER stress, mitochondrial damage, and autophagy. Further studies are needed to unravel the molecular mechanisms underlying EFF-Cp bioactivity.

Tirando partido do modelo de levedura desenvolvido neste estudo, recorremos a células YAA5\_ppIAPP-GFP para rastrear a bioatividade do extrato e EFF-Cp de *C. pachystachya* na modulação da via de sinalização do Ca<sup>2+</sup> e consequente ativação do Crz1. Uma vez que o tratamento com a concentração mais baixa (50 µg/mL) de EFF-Cp protegeu significativamente as células contra a toxicidade do ppIAPP-GFP, selecionamos esta concentração para realizar os testes adicionais. A incubação das células YAA5\_ppIAPP-GFP com extrato de *C. pachystachya* não afetou a atividade da β-galactosidase (Figura 4), o que está de acordo com sua ineficácia na proteção das células contra a toxicidade induzida pelo ppIAPP-GFP no ensaio de viabilidade. Da mesma forma, em células que expressam ppIAPP-GFP, nenhuma alteração na ativação do Crz1 foi observada após o tratamento com EFF-Cp. Uma vez que a EFF-Cp não é capaz de inibir a hiperativação do Crz1, colocamos então a hipótese de que o seu mecanismo de proteção contra os efeitos tóxicos do ppIAPP esteja a ocorrer de forma independente da via CaM/CaN. Estudos adicionais serão necessários para compreender totalmente o modo de ação molecular e celular subjacente ao efeito protetor da EFF-Cp.

## Conclusões

Através do desenvolvimento de um modelo de levedura que simultaneamente expressa ppIAPP e que atua como um sensor dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, o nosso estudo forneceu novos dados sobre a interferência do ppIAPP na sinalização deste íon. A expressão do ppIAPP induziu a hiperativação da atividade do Crz1, o que nos permitiu identificar a desregulação da sinalização do Ca<sup>2+</sup> como um dos mecanismos patológicos subjacentes à citotoxicidade do ppIAPP. A par disto, demonstrámos também que a eficácia da EFF-Cp na melhoria da viabilidade celular não é mediada por alterações na sinalização do Ca<sup>2+</sup>, sugerindo que outros mecanismos podem estar associados a essa resposta protetora. Digno de nota, a composição química da EFF-Cp é enriquecida em ácido clorogénico e isoorientina, dois metabolitos secundários que exercem propriedades protetoras contra complicações diabéticas e efeitos patológicos do IAPP. Com base nas evidências relatadas, parece plausível levantar a hipótese de que a proteção celular mediada pela EFF-Cp pode incluir a mitigação do stress oxidativo, stress do retículo endoplasmático, dano mitocondrial e autofagia. No entanto, mais estudos serão necessários para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes à bioatividade da EFF-Cp.

### **Authors contributions statement**

RM and RT conceived and designed the experiments. SF performed the experiments. SF, RT, AFR, FMS, FHR, NS and RM analyzed the data and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

### **Acknowledgements**

This study was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, grant numbers PTDC/BIA-MOL/31104/2017 (RM) and UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020 (CBIOS). iNOVA4Health Research Unit (LISBOA—01—0145—FEDER—007344), which is cofunded by FCT/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, through national funds, and by FEDER under the PT2020 Partnership Agreement, is also acknowledged. Authors would like to acknowledge FCT for the financial support of AFR (PD/BD/135504/2018); SF (UI/BD/151421/2021), and RM (CEEC/04567/CBIOS/2020).

### **Conflict of interests**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Declaração sobre as contribuições do autor**

RM e RT conceberam e desenharam as experiências. SF realizou as experiências. SF, RT, AFR, FMS, FHR, NS e RM analisaram os dados e escreveram o artigo. Todos os autores contribuíram para o artigo e aprovaram a versão submetida.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, números de bolsas PTDC/BIA-MOL/31104/2017 (RM) e UIDB/04567/2020 e UIDP/04567/2020 (CBIOS). A Unidade de Pesquisa iNOVA4Health (LISBOA-01-0145-FEDER-007344), que é co-financiada pela FCT/Ministério da Ciência e do Ensino Superior, por meio de fundos nacionais, e pela FEDER no âmbito do Acordo de Parceria PT2020, também é reconhecida. Os autores gostariam de agradecer à FCT pelo apoio financeiro prestado à AFR (PD/BD/135504/2018); SF (UI/BD/151421/2021) e RM (CEEC/04567/CBIOS/2020).

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## References / Referências

- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet (London, England)*, 383(9922), 1068–1083. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62154-6
- Westermarck, P., Andersson, A., & Westermarck, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological Reviews*, 91(3), 795–826. doi: 10.1152/physrev.00042.2009
- Raimundo, A. F., Ferreira, S., Martins, I. C., & Menezes, R. (2020). Islet Amyloid Polypeptide: A Partner in Crime With A $\beta$  in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 35. doi: 10.3389/fnmol.2020.00035
- Huang, C., Lin, C., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A. E., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2007). High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes*, 56(8), 2016–2027. doi: 10.2337/db07-0197
- Abedini, A., & Schmidt, A. M. (2013). Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes. *FEBS Letters*, 587(8), 1119–1127. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.017
- Anguiano, M., Nowak, R. J., & Lansbury, P. T. J. (2002). Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry*, 41(38), 11338–11343. doi: 10.1021/bi020314u
- Rivera, J. F., Costes, S., Gurlo, T., Glabe, C. G., & Butler, P. C. (2014). Autophagy defends pancreatic  $\beta$  cells from Human islet amyloid polypeptide-induced toxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3489–3500. doi: 10.1172/JCI71981
- Mattson, M. P., & Chan, S. L. (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1041–1043. doi: 10.1038/ncb1203-1041
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., Wanner, T., Tanzi, R. E., Sawa, A., Dawson, V., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (2001). Inducible expression of mutant  $\alpha$ -synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Human Molecular Genetics*, 10(9), 919–926. doi: 10.1093/hmg/10.9.919
- Casas, S., Novials, A., Reimann, F., Gomis, R., & Gribble, F. M. (2008). Calcium elevation in mouse pancreatic beta cells evoked by extracellular human islet amyloid polypeptide involves activation of the mechanosensitive ion channel TRPV4. *Diabetologia*, 51(12), 2252–2262. doi: 10.1007/s00125-008-1111-z
- Casas, Silvia, Gomis, R., Gribble, F. M., Altirriba, J., Knuutila, S., & Novials, A. (2007). Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes*, 56(9), 2284–2294. doi: 10.2337/db07-017
- Klec, C., Ziomek, G., Pichler, M., Malli, R., & Graier, W. F. (2019). Calcium Signaling in  $\beta$ -cell Physiology and Pathology: A Revisit. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). doi: 10.3390/ijms20246110
- Sabatini, P. V., Speckmann, T., & Lynn, F. C. (2019). Friend and foe:  $\beta$ -cell Ca<sup>2+</sup> signaling and the development of diabetes. *Molecular Metabolism*, 21, 1–12. doi: 10.1016/j.molmet.2018.12.007
- Aragão, D. M. O., Guarize, L., Lanini, J., da Costa, J. C., Garcia, R. M. G., & Scio, E. (2010). Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(3), 629–633. doi: 10.1016/j.jep.2010.01.008
- Pereira, E. D. de M., da Silva, J., Carvalho, P. da S., Grivicich, I., Picada, J. N., Salgado Júnior, I. B., Vasques, G. J., Pereira, M. A. da S., Reginatto, F. H., & Ferraz, A. de B. F. (2020). In vivo and in vitro toxicological evaluations of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 83(19–20), 659–671. doi: 10.1080/15287394.2020.1811817
- Campos, M. L. de, Castro, M. B. de, Campos, A. D., Fernandes, M. F., Conegundes, J. L. M., Rodrigues, M. N., Mügge, F. L. B., Silva, A. M. da, Sabarense, C. M., Castañón, M. C. M. N., Andreazzi, A. E., & Scio, E. (2021). Antiobesity, hepatoprotective and anti-hyperglycemic effects of a pharmaceutical formulation containing *Cecropia pachystachya* Trécul in mice fed with a hypercaloric diet. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114418. doi: 10.1016/j.jep.2021.114418
- Rivera-Mondragón, A., Ortíz, O. O., Bijttebier, S., Vlietinck, A., Apers, S., Pieters, L., & Caballero-George, C. (2017). Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1500–1512. doi: 10.1080/13880209.2017.1307421
- Pacheco, N. R., Pinto, N. de C. C., da Silva, J. M., Mendes, R. de F., da Costa, J. de C., Aragão, D. M. de O., Castañón, M. C. M. N., & Scio, E. (2014). *Cecropia pachystachya*: a species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. *BioMed Research International*, 2014, 301294. doi: 10.1155/2014/301294
- Aragão, D. M. de O., Lima, I. V. de A., da Silva, J. M., Bellozi, P. M. Q., da Costa, J. de C., Cardoso, G. M. M., de Souza-Fagundes, E. M., & Scio, E. (2013). Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. *Phytotherapy Research: PTR*, 27(6), 926–930. doi: 10.1002/ptr.4811
- Gazal, M., Kaufmann, F. N., Acosta, B. A., Oliveira, P. S., Valente, M. R., Ortmann, C. F., Sturbelle, R., Lencina, C. L., Stefanello, F. M., Kaster, M. P., Reginatto, F. H., & Ghisleni, G. (2015). Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. *Neurochemical Research*, 40(7), 1421–1430. doi: 10.1007/s11064-015-1610-5
- Ortmann, C. F., Réus, G. Z., Ignácio, Z. M., Abelaira, H. M., Titus, S. E., de Carvalho, P., Arent, C. O., Dos Santos, M. A. B., Matias, B. I., Martins, M. M., de Campos, A. M., Petronilho, F., Teixeira, L. J., Morais, M. O. S., Streck, E. L., Quevedo, J., & Reginatto, F. H. (2016). Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. *Neurotoxicity Research*, 29(4), 469–483. doi: 10.1007/s12640-016-9596-6
- Gazal, M., Ortmann, C. F., Martins, F. A., Streck, E. L., Quevedo, J., de Campos, A. M., Stefanello, F. M., Kaster, M. P., Ghisleni, G., Reginatto, F. H., & Lencina, C. L. (2014). Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*, 108, 10–17. doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.07.007
- Raimundo, A. F., Ferreira, S., Farrim, M. I., Santos, C. N., & Menezes, R. (2020). Heterologous Expression of Immature Forms of Human Islet Amyloid Polypeptide in Yeast Triggers Intracellular Aggregation and Cytotoxicity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2035. doi: 10.3389/fmicb.2020.02035
- Costa, G. M., Ortmann, C. F., Schenkel, E. P., & Reginatto, F. H. (2011). An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1096–1002. doi: 10.1590/S0103-50532011000600014
- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast*, 7(3), 253–263. doi: 10.1002/yea.320070307
- Garcia, G., Santos, C. N. do, & Menezes, R. (2016). High-Throughput Yeast-Based Reporter Assay to Identify Compounds with Anti-inflammatory Potential. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1449, 441–452. doi: 10.1007/978-1-4939-3756-1\_29
- Araki, Y., Wu, H., Kitagaki, H., Akao, T., Takagi, H., & Shimoi, H. (2009). Ethanol stress stimulates the Ca<sup>2+</sup>-mediated calcineurin/Crz1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(1), 1–6. doi: 10.1016/j.jbiosc.2008.09.005
- Dudnik, A., Almeida, A. F., Andrade, R., Avila, B., Bañados, P., Barbay, D., Bassard, J.-E., Benkoulouche, M., Bott, M., Braga, A., Breitel, D., Brennan, R., Bulteau, L., Chanforan, C., Costa, I., Costa, R. S., Doostmohammadi, M., Faria, N., Feng, C., ... Forster, J. (2018). BacHBerry: BACterial Hosts for production of Bioactive phenolics from bERRY fruits. *Phytochemistry Reviews*, 17(2), 291–326. doi: 10.1007/s11101-017-9532-2



29. Menezes, R., Foito, A., Jardim, C., Costa, I., Garcia, G., Rosado-Ramos, R., Freitag, S., Alexander, C. J., Outeiro, T. F., Stewart, D., & Santos, C. N. (2020). Bioprospection of Natural Sources of Polyphenols with Therapeutic Potential for Redox-Related Diseases. *Antioxidants*, *9*(9). doi: 10.3390/antiox9090789
30. Kallscheuer, N., Menezes, R., Foito, A., da Silva, M. H., Braga, A., Dekker, W., Sevillano, D. M., Rosado-Ramos, R., Jardim, C., Oliveira, J., Ferreira, P., Rocha, I., Silva, A. R., Sousa, M., Allwood, J. W., Bott, M., Faria, N., Stewart, D., Ottens, M., ... Marienhagen, J. (2019). Identification and Microbial Production of the Raspberry Phenol Salidroside that Is Active against Huntington's Disease. *Plant Physiology*, *179*(3), 969–985. doi: 10.1104/pp.18.01074
31. Cheng, B., Liu, X., Gong, H., Huang, L., Chen, H., Zhang, X., Li, C., Yang, M., Ma, B., Jiao, L., Zheng, L., & Huang, K. (2011). Coffee Components Inhibit Amyloid Formation of Human Islet Amyloid Polypeptide in Vitro: Possible Link between Coffee Consumption and Diabetes Mellitus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(24), 13147–13155. doi: 10.1021/jf201702h
32. Karthikesan, K., Pari, L., & Menon, V. P. (2010a). Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *General Physiology and Biophysics*, *29*(1), 23–30. doi: 10.4149/gpb\_2010\_01\_23
33. Karthikesan, K., Pari, L., & Menon, V. P. (2010b). Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin–nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *Journal of Functional Foods*, *2*(2), 134–142. doi: 10.1016/j.jff.2010.04.00
34. Miao M, & Xiang L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Advances in Pharmacology*, *87*, 71–88. doi: 10.1016/bs.apha.2019.12.002
35. Kolb, H., Martin, S., & Kempf, K. (2021). Coffee and Lower Risk of Type 2 Diabetes: Arguments for a Causal Relationship. *Nutrients*, *13*(4). doi: 10.3390/nu13041144
36. Ziqubu, K., Dlodla, P. V., Joubert, E., Muller, C. J. F., Louw, J., Tiano, L., Nkambule, B. B., Kappo, A. P., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2020). Isoorientin: A dietary flavone with the potential to ameliorate diverse metabolic complications. *Pharmacological Research*, *158*, 104867. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104867
37. Gilon, P., Chae, H.-Y., Rutter, G. A., & Ravier, M. A. (2014). Calcium signaling in pancreatic  $\beta$ -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium*, *56*(5), 340–361. doi: 10.1016/j.ceca.2014.09.001
38. Jung, H.-J., Im, S.-S., Song, D.-K., & Bae, J.-H. (2017). Effects of chlorogenic acid on intracellular calcium regulation in lysophosphatidylcholine-treated endothelial cells. *BMB Reports*, *50*(6), 323–328. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.6.182