



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Participación de *Cucurbita ficifolia* Bouché en el metabolismo de la glucosa y lípidos mediante la activación de PPAR’s en adipocitos y hepatocitos.”

TESIS

Que para obtener el grado de maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. JESÚS VLADIMIR HERNÁNDEZ ROSADO

Directores:

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Dra. Rebeca García Macedo

Asesor:

Dr. Rubén Román Ramos

México D.F. Noviembre 2012

COMITÉ TUTORAL

Co-directores:

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Profesor titular C

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

jcap@xanum.uam.mx

Dra. Rebeca García Macedo

Investigadora asociada C

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades

CMN SXXI. IMSS

gamareb@yahoo.es

Asesor:

Dr. Rubén Román Ramos.

Profesor titular C

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

rrr@xanum.uam.mx

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Para la realización de los estudios de maestría el alumno Jesús Vladimir Hernández Rosado contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro de la beca 372879/CVU:290604. Este proyecto fue parcialmente financiado por SEP-PROMEP bajo el folio UAM-PTC-218.

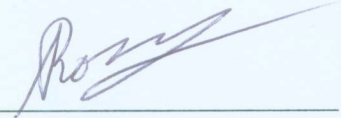
MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión de posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada "Participación de *Cucurbita ficifolia* Bouché en el metabolismo de la glucosa y lípidos mediante la activación de PPAR's en adipocitos y hepatocitos", con fecha de presentación para obtener el grado de Maestría el día 23 de Noviembre de 2012.

Dr. Rubén Román Ramos.

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.



Presidente

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto.

Facultad de Farmacia.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

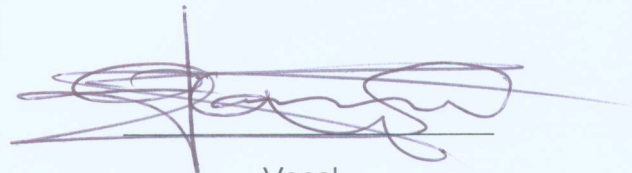


Secretario

Juan Gabriel Navarrete Vázquez.

Facultad de Farmacia.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

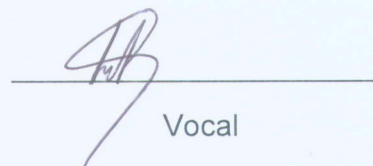


Vocal

Dr. Fausto Sánchez Muñoz.

Dpto. de Inmunología.

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".



Vocal

DEDICATORIA

A mi madre y hermana; mis razones de vivir y mi mayor impulso para continuar en este camino empedrado de sueños. Siempre juntos, con la frente en alto y sonriéndole a la vida a pesar de las circunstancias. Esto es un pequeño regalo para Ustedes; las amo.

A minha VIDA por acompañarme y tomar mi mano aún en los momentos más difíciles. *Haja o que houver meu coração.*

“No hagas nada por obligación ni por compromiso sino por amor, entonces habrá plenitud y en esa plenitud todo es posible y sin esfuerzo porque te mueve la fuerza natural de la vida”...Facundo Cabral.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia; abuelos, tíos, primos, sobrinos y a la pequeña Vica, para quienes espero ser motivo de orgullo así como ser ejemplo de que las metas se pueden alcanzar siempre y cuando uno se mantenga firme en sus decisiones.

A mis amigos, mi segunda familia, gracias por escucharme y brindarme su apoyo y abrazo sincero cuando más derrotado me sentía. Gracias Rosario, Erika y Verónica, con quienes he compartido lágrimas, locuras, y mi amor por una amistad que como dice mi papá... “durará para toda la vida”, pero yo estoy seguro que continuará aún después de la muerte. Solo me resta decirles, GRACIAS.

A mi padre y hermana por sus palabras y motivación. Los llevo siempre en mis pensamientos y en el corazón. Gracias por formar parte de todo.

Al Dr. Rubén Román, la Dra. Rebeca García y al Dr. Julio Cesar Almanza, por depositar su confianza en mi trabajo así como por darme las armas para defender y proponer nuevos retos que espero y aún estén dispuestos a desarrollarlos con este aprendiz de investigador.

“Gracias VIDA por las experiencias vividas, por los sueños cumplidos y los que me faltan por realizar, por las personas que he conocido y las que todavía no conozco, por las lágrimas derramadas que me han hecho más fuerte; gracias por todo”...

INDICE

I. RESUMEN.

II. ABSTRACT.

III. INTRODUCCIÓN.

III.1 MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	03
III.1.1. DT2 Y SU TRATAMIENTO	09
III.1.1.1. FÁRMACOS ORALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA DT2	07
III.1.2. PPARs Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y LOS ÁCIDOS GRASOS	09
III.1.2.1. PPAR- α	11
III.1.2.2. PPAR- β	14
III.1.2.3. PPAR- γ	17
III.1.3. ANTECEDENTES DE <i>C. ficifolia</i> BOUCHÉ	19
III.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21

IV. JUSTIFICACIÓN.

V. HIPÓTESIS.

VI. OBJETIVOS.

VII. METODOLOGÍA CIENTÍFICA.

VII.1. MATERIAL VEGETAL	26
VII.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	26
VII.3. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO	26
VII.4 LAS LINEAS CELULARES	26
VII.5. ENSAYO DE FUNCIONALIDAD	29
VII.6. EXPERIMENTOS EN CÉLULAS DE LA LINEA HepG2	31
VII.7. EXPERIMENTOS EN CÉLULAS DE LA LINEA 3T3-L1	33
VII.8. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RNA's MENSAJEROS	35

VIII. RESULTADOS.

VIII.1. FUNCIONALIDAD DE HEPATOCITOS HepG2	42
VIII.2. FUNCIONALIDAD DE ADIPOCITOS 3T3-L1	44

VIII.3. CUANTIFICACIÓN DE RNAm DE PPAR- α , PPAR- β , ACSL-1,
GLUT-1 Y FATP-1 EN HepG2
47

VIII.4 CUANTIFICACIÓN DE RNAm DE PPAR- α , PPAR- β , ACSL-1, GLUT-
4 Y ADIPONECTINA EN ADIPOCITOS 3T3-L1
52

IX. DISCUSIÓN 56

X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 66

XI. REFERENCIAS

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
IDF	Federación Internacional de Diabetes
DT1	Diabetes mellitus tipo 1
DT2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
SSA	Secretaría de Salud
BDMTM	Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana
RI	Resistencia a la Insulina
TZDs	Tiazolidinedionas
GLP-1	Péptido 1 similar la glucagon
PPAR-γ	Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma

LPL	Proteína transportadora de ácidos grasos
Lipoproteína lipasa	
FATP	
ACSL-1	Isoforma 1 de acetil CoA sintetasa
aP2	Proteína fijadora de ácidos grasos en adipocitos
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GLUT-4	Transportador de glucosa 4
FFAs	Ácidos grasos libres
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
IL-6	β-oxidación
TG	Interleucina 6
IRS-2	Trigliceridos
MP	Sustrato del receptor de insulina 2
PPAR-α	Membrana plasmática
FAT	Receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa

Traslocasa de ácidos grasos	MIX
Beta oxidación	DX
ACO	Acil-CoA oxidasa
HDL-colesterol	Lipoproteína de alta densidad
ApoAI	Apolipoproteína AI
ApoAII	Apolipoproteína AII
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
PPAR-δ	Receptor activado por proliferador de peroxisoma delta
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LCFA	Ácidos grasos de cadena larga
<i>C. ficifolia</i>	<i>Cucurbita ficifolia</i>
msnm	Metros sobre el nivel del mar
D-QI	D-quirositol
MT	Medicina tradicional
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión

Metilhidroxibutilxantina

Dexametasona

RT-PCR

Reacción en reversa acoplada a
reacción en cadena de la polimerasa

cDNA

DNA complementario

EMSA

Ensayo de retardo electroforético

GADPH

Gliceraldehido 3-fosfato
deshidrogenasa

ns

Diferencia no significativa

PPREs

Elementos de respuesta a PPARs

EEM

Error estándar de la media

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Funcionalidad de hepatocitos	42
Gráfico 2. Funcionalidad de adipocitos	44
Gráfico 3. Expresión relativa del RNAm de PPAR- α en hepatocitos	47
Gráfico 4. Expresión relativa del RNAm de PPAR- α en hepatocitos	48
Gráfico 5. Expresión relativa del RNAm de GLUT-1 en hepatocitos	49
Gráfico 6. Expresión relativa del RNAm de ACSL-1 en hepatocitos	50
Gráfico 7. Expresión relativa del RNAm de FATP-1 en hepatocitos	51
Gráfico 8. Expresión relativa del RNAm de PPAR- α en adipocitos	52
Gráfico 9. Expresión relativa del RNAm de PPAR- α en adipocitos	53
Gráfico 10. Expresión relativa del RNAm de GLUT-4 en adipocitos	54
Gráfico 11. Expresión relativa del RNAm de FATP-1 en adipocitos	55
Gráfico 12. Expresión relativa del RNAm de AdipoQ en adipocitos	56

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Concentraciones de D-QI aplicadas a las líneas celulares HepG2 y 3T3-L1	30
Tabla 2. Concentraciones empleadas para el tratamiento de las células HepG2	32
Tabla 3. Concentraciones empleadas para el tratamiento de las células 3T3-L1	35
Tabla 4. Cebadores utilizados para el análisis de expresión en HepG2 y 3T3-L1	40
Tabla 5. Porcentajes de funcionalidad de HepG2 con extracto acuoso de <i>C. ficifolia</i>	43
Tabla 6. Porcentajes de funcionalidad de HepG2 con D-QI	43
Tabla 7. Porcentajes de funcionalidad de 3T3L1 con extracto acuoso de <i>C. ficifolia</i>	45
Tabla 8. Porcentajes de funcionalidad de 3T3L1 con D-QI	45
Figura 1. Principales efectos de los PPARs en sus órganos blanco	11
Figura 2. Mecanismo de acción de las TZDs	13

Figura 3. Efectos de agonista duales de PPAR- α y PPAR- β	
16	
Figura 4. Efectos producidos por la activación de PPAR- α	
18	
Figura 5. Fruto maduro de <i>C. ficifolia</i>	19
Figura 6. Reducción del MTS a formazán	29
Figura 7. Células de la línea HepG2	32
Figura 8. Fibroblastos de la línea celular 3T3-L1	34
Figura 9. Adipocitos al octavo día de diferenciación	34
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para la comprobación de los productos en células HepG2	38
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para la comprobación de los productos en células 3T3-L1	39

I. RESUMEN

La DT2 es la principal causa de muerte en la población mexicana de entre 20 y 75 años. Además de la terapia farmacológica, la población hace uso de plantas reportadas como hipoglucemiantes en la medicina tradicional, como medio alternativo para su tratamiento. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto del extracto acuoso del fruto de *Cucurbita ficifolia*, sobre la expresión de RNAs mensajeros de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) y transportadores involucrados en el metabolismo de glucosa y ácidos grasos (GLUT, FATP), en líneas celulares de hepatocitos y adipocitos. La concentración del extracto acuoso (0.078 mM) a la cuál fueron tratadas las líneas celulares de hepatocitos HepG2 y adipocitos 3T3-L1 se determinó con base en su contenido de D-quirositol. Se utilizaron fenofibrato (100 μ M), pioglitazona (10 μ M) y L-165041 (1 μ M) como agonistas de PPAR- α , PPAR- γ y PPAR- δ , respectivamente. Después de 24 h de tratamiento se cuantificó la expresión de los RNAs mensajeros, tanto de los PPARs como de GLUT-1, ACSL-1 y FATP-1 en hepatocitos, y GLUT-4, FATP-1 y AdipoQ en adipocitos mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados muestran

que el extracto produce aumento significativo en la expresión de PPAR- α , PPAR- γ y GLUT-1 en células HepG2; mientras que en los adipocitos se observó un aumento en la expresión tanto de GLUT-4 como de FATP-1. Esto abre la posibilidad de que el extracto esté actuando a nivel del transporte de glucosa en tejido hepático y mediante el almacenamiento de glucosa y AG en forma de TG en el tejido adiposo. Además permiten postular a *C. ficolia* como agonista dual de los PPARs, lo cual podría tener implicaciones tanto metabólicas como antiinflamatorias.

II. ABSTRACT

Type 2 diabetes is the leading cause of death in Mexican population between 20 and 75 years old. In addition to drug therapy, people use plants reported as hypoglycemic in traditional medicine, in order to get an alternative for treatment. The aim of this study was to evaluate the effect of aqueous extract of the fruit of *Cucurbita ficifolia* on messenger RNA expression of the peroxisome proliferators activated receptors (PPARs) and the transporters involved in glucose and fatty acids metabolism (GLUT, FATP) in hepatocyte and adipocytes cell lines. The aqueous extract concentration (0.078 mM) used for test in HepG2 and 3T3-L1 adipocytes cell lines was determined based on their content of D-chiroinositol. Fenofibrate (100 μ M), pioglitazone (10 mM) and L-165041 (1 μ M) as PPAR- α , PPAR- γ and PPAR- δ agonist, were used respectively. After 24 h of treatment, messenger RNA expression both PPARs,

GLUT-1, ACSL-1 and FATP-1 in hepatocytes and GLUT-4, FATP-1 and adipoQ in adipocytes was quantified by means of real-time PCR. Results show that the extract produced a significant increase in the expression of PPAR- α , PPAR- γ and GLUT-1 in HepG2 cells, by the other side in adipocytes an increase in expression of both GLUT-4 and FATP-1 was observed. This opens the possibility that the extract could be acting at the level of glucose transport and hepatic tissue by glucose and AG storage in a TG way in adipose tissue. Also let propose *C. ficifolia* as dual agonist for the PPAR's, which could have both metabolic and inflammatory implications.

III. INTRODUCCION

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (Kendal *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; OMS, 2011; IDF, 2011).

La diabetes mellitus (DM) se clasifica en cuatro tipos: Tipo 1 (DT1), Tipo 2 (DT2), diabetes gestacional (DMG) y otros tipos específicos. La DT1 se caracteriza por la falta de insulina debida a una alteración autoinmune y con la consecuente destrucción de las células beta pancreáticas. La DT2 es causada por una reducción en la acción a la insulina, conjuntamente con una inadecuada secreción de ésta como respuesta compensatoria a la resistencia a la insulina. La RI se manifiesta cuando órganos sensibles a esta hormona como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo no responden de manera adecuada a su señalización; dando como resultado condiciones de hiperglucemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia, las cuales puede ocasionar un daño en la células □ del páncreas conduciendo a un estado diabético. Los pacientes con DT2 muestran valores de glucosa preprandial cercanos a 126 mg/dL; mientras que en condiciones normales estos valores son menores a 110 mg/dL (Matthaei *et al.*; 2000). La DMG es una intolerancia a la glucosa de distintos grados de gravedad que se presenta en el último tercio del embarazo. Otros tipos específicos pueden ser ocasionados por defectos genéticos en la función de las células beta o en la acción de la insulina por enfermedades del páncreas exocrino, así como por fármacos y agentes químicos que la induzcan (IDF, 2011). Los

fármacos usados actualmente para el tratamiento de la DT2 tienen un amplio rango de mecanismos de acción y su principal efecto es la reducción de la hiperglucemia, dejando a un lado algunas complicaciones de origen vascular. Algunos de ellos actúan como secretagogos (sulfonilureas), otros influyen directamente sobre el metabolismo de la glucosa como las biguanidas (metformina), mientras que otros lo hacen activando receptores nucleares que promueven la síntesis de transportadores de glucosa y ácidos grasos, así como enzimas que tienen influencia sobre el metabolismo de los lípidos y glucosa; ejemplo de ello son las tiazolidinedionas (TZDs) (Bailey, 2000). Aún a pesar del tratamiento farmacológico existente, la población mundial recurre a las plantas medicinales para contrarrestar los malestares causados por la DT2.

El uso de las plantas medicinales con capacidad hipoglucemiante es un recurso muy socorrido por la población mexicana. *Cucurbita ficifolia* Bouché es sólo un ejemplo de las 306 especies de 235 géneros y 93 familias de plantas usadas con este fin que se han documentado en el país (Andrade y Heinrich, 2005).

Tanto la pluriculturalidad como la materia prima existente en nuestro México, permiten que contemos con un amplio campo de investigación y abre la posibilidad de desarrollar nuevos medicamentos en beneficio de la salud nacional y mundial.

III.1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

III.1.1. DT2 Y SU TRATAMIENTO.

La DT2 es un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos donde la interacción entre factores ambientales y genéticos lleva al desarrollo de resistencia a la insulina (RI) y a la disfunción de las células beta en el páncreas. Aproximadamente del 85% al 90 % de los casos de diabetes a nivel mundial corresponden a DT2 (Hu *et al.*, 2001, Tahrani *et al.*, 2010, IDF, 2011, OMS, 2011).

El tratamiento de la diabetes está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y prevenir el desarrollo de complicaciones agudas y crónicas. La Asociación Americana de Diabetes y el Grupo de Vigilancia Europeo para la Diabetes recomienda corregir las alteraciones en todos los pacientes diabéticos seguido de un buen control metabólico que debe evidenciarse a través de criterios bioquímicos (Mateos y Zacarías, 2002).

Las recomendaciones dietéticas para pacientes que padecen DT2 incluyen un porcentaje de carbohidratos de aproximadamente el 50% de la ingesta calórica diaria, proteínas 10- 20% y grasas 10-20%. Menos del 10% de estas calorías deben ser grasas saturadas, y menor o igual al 10% de grasas poliinsaturadas, con menos de 300 mg de colesterol, 25-35 g de fibra y no más de 3 g de sodio/día. Además, la recomendación de hacer ejercicio físico en la diabetes busca mejorar el metabolismo de carbohidratos y la sensibilidad a la insulina (Cheng y Fantus, 2005; Committee Report, 2008).

En lo que respecta a la terapia farmacológica, aparte de la insulina que es el fármaco hipoglucemiante más efectivo, también existen fármacos que se administran por vía oral, como: las sulfonilureas y las glinidas, que estimulan el páncreas a producir más insulina; las biguanidas, que disminuyen la cantidad de glucosa producida por el hígado; los inhibidores de la α -glucosidasa, que actúan disminuyendo la absorción de carbohidratos desde el tracto digestivo, reduciendo así los niveles de glucosa después de las comidas; las tiazolidinedionas (TZDs), que promueven la producción de transportadores de glucosa y sensibilizan la acción de la insulina; los análogos del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) e inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (gliptinas), que potencian la secreción de insulina dependiente de glucosa y suprimen la secreción hepática del glucagón (Alberti *et al.*, 2007; Committee Report, 2008).

La DT2 es un desorden metabólico caracterizado por la presencia de RI y está relacionado con enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, hipertensión, disfunción endotelial y cardíaca así como con el infarto al miocardio; patologías que son la principal causa de muerte en los pacientes con DT2 (Balakumar *et al.*, 2007). En condiciones normales, la insulina reprime la liberación de glucosa hepática mediante la inhibición de la gluconeogénesis y la glucogenolisis e incrementa la síntesis de glucógeno (glucogénesis). En el músculo esquelético incrementa la captación y utilización de glucosa; mientras que en el tejido adiposo inhibe la lipólisis y aumenta el almacenamiento de ácidos grasos mediante la lipogénesis. Por el contrario; en estados de RI; se reprime la inhibición de la glucosa hepática promoviendo su producción a través de la gluconeogénesis, disminuye la

captación de glucosa en el músculo esquelético y además hay una represión de la lipogénesis. Lo anterior trae como consecuencia, un aumento en las concentraciones de glucosa (hiperglucemia) así como un incremento en las concentraciones de ácidos grasos no esterificados en el plasma. En respuesta a la hiperglucemia, se produce una hipersecreción de insulina por parte de las células β -pancreáticas que puede conducir a un daño en su función y por consecuencia intolerancia a la glucosa, incrementando aún más el estado hiperglucémico y llevando al desarrollo de DT2 (Kalupahana; *et al.* 2012). Actualmente, los PPARs son un blanco de estudio debido a que su activación puede mejorar los desordenes a nivel lipídico y de glucosa presentes en la DT2. A manera de resumen, la activación de PPAR- α reduce la concentración de TG y está involucrada en la homeostasis energética. La activación de PPAR- α promueve un incremento en la sensibilidad a la insulina y aumenta el metabolismo de la glucosa; mientras que la activación de PPAR- β incrementa el metabolismo de los ácidos grasos. Dentro de las drogas que participan como agonistas de PPARs se encuentran los fibratos, que actúan como drogas hipolipidémicas al promover la activación de PPAR- α ; mientras que las TZDs actúan como agentes antidiabéticos mediante la activación de PPAR- γ . Los agonistas que actúan como agentes hipolipidémicos a través de la activación de PPAR- α aún se encuentran en fase de investigación clínica (Balakumar *et al.*, 2007; Berger y Moller, 2002; Gross y Staels, 2007).

III.1.1.1. FÁRMACOS ORALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA DT2.

Los principales tipos de fármacos orales que se utilizan actualmente para el tratamiento de la DT2 tienen un amplio rango de mecanismos de acción. Los principales son los que estimulan la secreción de insulina (sulfonilureas y secretagogos de acción rápida), los que reducen la producción de glucosa hepática (biguanidas), quienes disminuyen la digestión y absorción de carbohidratos en el intestino (inhibidores de la alfa-glucosidasa) y los que mejoran la acción de la insulina como la TZDs (Krentz y Bailey, 2005)

Las sulfonilureas son ácidos débiles que aumentan la secreción de insulina mediante su unión con los receptores SUR1 en las células β -pancreáticas, lo que trae como consecuencia el bloqueo de los canales de potasio sensibles a ATP y la liberación de insulina. Dentro de sus efectos secundarios están la ganancia de peso y la hipoglucemia por lo que está contraindicado en pacientes con falla renal o los que son propensos a desencadenar una hipoglucemia (Mateos N y Zacarías, 2002, Krentz y Bailey, 2005, Tahrani *et al.*, 2010). Las meglitidinas son medicamentos de acción rápida cuyo mecanismo de acción es muy parecido a las sulfonilureas solo que el comienzo de su efecto así como su duración es más corto en comparación son las antes mencionadas (Tahrani *et al.*, 2010, Campbell, 2005). Dentro de las biguanidas, la metformina es el medicamento de primera línea recomendado para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y actúa disminuyendo la producción de glucosa hepática así como la RI en los órganos periféricos (Tahrani *et al.*, 2010).

La acarbosa es un potente inhibidor competitivo de la alfa-glucosidasa y actúa reduciendo la absorción de carbohidratos en el intestino. Al disminuir la absorción de carbohidratos complejos, disacáridos y monosacáridos se reducen los picos de glucosa posprandial en sangre. Su principal efecto secundario es la tendencia a causar efectos adversos gastrointestinales (Tahrani *et al.*, 2010).

Las TZDs funcionan como agonistas de PPAR- α , mejorando la sensibilidad a la insulina mediante el incremento de la lipogénesis en el tejido adiposo, reduciendo el contenido de grasa y disminuyendo la producción de glucosa en el hígado (Berger y Moller, 2002, Gross y Staels, 2007, Tahrani *et al.*, 2010). Uno de los efectos adversos es el aumento a la predisposición de padecer enfermedades cardiovasculares y falla renal. Por lo anterior, la rosiglitazona actualmente no es recomendada en personas con antecedentes de síndrome coronario agudo, aunque no sucede lo mismo con la pioglitazona que se sigue utilizando sin ninguna restricción (Tahrani *et al.*, 2010).

Los agonistas altamente selectivos que combinan los efectos terapéuticos de PPAR α y PPAR γ incrementan la eficacia en el tratamiento de la DM2. La activación simultánea de PPAR α y PPAR γ mediante compuestos agonistas duales produce una alteración en la distribución de los FFAs en los tejidos, estimulando su captación en el tejido adiposo, hígado y músculo esquelético (Fiévet *et al.*, 2006; Balakumar *et al.*, 2007).

De los agonistas duales estudiados hasta el momento, los pertenecientes a la clase glitazar han llegado a fase III de estudio clínico (tabla 1). El muraglitazar, un agonista dual (α/α) de la familia glitazar, al activar PPAR α y β mejora la hiperglucemia y el desorden en el metabolismo de lípidos, al reducir los triglicéridos e incrementar las HDL-colesterol en humanos (Kendall et al., 2006). Kendall y col. demostraron que el muraglitazar contrarresta el desorden lipídico y glucémico en pacientes con DM2 a la dosis de 5 mg, mientras que la pioglitazona ejerce el mismo efecto a la dosis de 30 mg. Además, controla de manera más eficiente los niveles glucémicos en pacientes diabéticos en comparación con pacientes tratados sólo con metformina (Kendall et al., 2006).

A pesar de los efectos benéficos sobre la homeostasis de la glucosa y lípidos, el estudio de estos compuestos se ha detenido debido a los efectos adversos que mostraron en humanos, como insuficiencia cardíaca, edema y ganancia de peso; siendo estos dos últimos los más comunes (Fiévet et al., 2006).

III.1.2. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARs) Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE GLUCOSA Y ÁCIDOS GRASOS.

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son factores de transcripción que pertenecen a una superfamilia de factores nucleares. La subfamilia

PPAR tiene tres isoformas, conocidas como PPAR- α , PPAR- β , and PPAR- γ . PPAR- γ se expresa predominantemente en hígado, riñón, músculo esquelético y grasa parda y está relacionado con la captación, activación y oxidación de los ácidos grasos (Berger y Moller 2002, Takahashi *et al.*, 2002, Fiévet *et al.*, 2006, Haluzink y Haluzink 2006). El PPAR β se expresa en mayor medida en adipocitos y está implicado en el almacenamiento de lípidos a través de la inducción de la adipogénesis. PPAR- α interviene en la regulación del colesterol y el metabolismo de lípidos, y se encuentra distribuido en la mayor parte de los tejidos; aunque en mayor medida en el músculo esquelético. Todos los miembros de la familia de los PPARs forman heteodímeros con el factor retinoide X 9-*cis* (RXR) que se unen a sus elementos de respuesta (PPREs) los cuales tienen una secuencia repetitiva AGGTCA dentro de la región promotora de los genes blanco (Seimandi *et al.*, 2005, Gross y Staels 2007, Ruan *et al.*, 2008). Actualmente, los PPARs han sido un blanco de estudio farmacológico ya que su activación puede mejorar las disfunciones metabólicas asociadas con la DT2 (Gross y Staels, 2007).

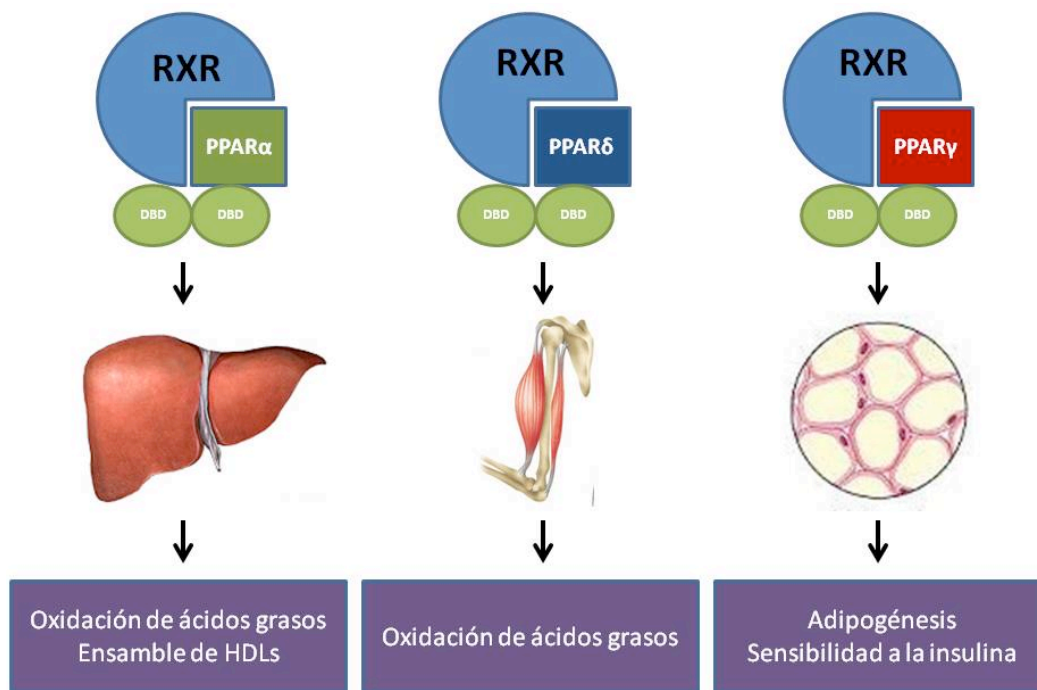


Figura 1. Efecto de los PPARs sobre sus órganos blanco. DBD: dominio de unión al DNA. Modificada de Ruan *et al.*, 2008.

III.1.2.1. PPAR-γ

Las TZDs promueven la sensibilidad a la insulina mediante su unión con el receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma (PPAR-γ) (Bailey *et al.*, 2000, Tahrani *et al.*, 2010, Dunn *et al.*, 2010), estimulando la expresión de genes que incrementan la lipogénesis en el tejido adiposo, reduciendo el contenido de grasa hepática, así como la producción de glucosa en hígado y mejorando la captación de glucosa por el adipocito (Bailey *et al.*, 2000, Suggi *et al.*, 2009, Tahrani *et al.*, 2010). Algunos de los genes que se expresan por acción del PPAR-γ son la lipoproteína

lipasa (LPL), proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP), proteína fijadora de ácidos grasos en adipocitos (aP2), acetil CoA sintetasa, enzima málica, así como transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 (Bailey *et al.*, 2000, Florez, 2003). Estos transportadores son las principales isoformas expresadas en el tejido adiposo y son importantes para la utilización de la glucosa periférica (Figura 2).

GLUT-1 es un transportador constitutivo que está presente tanto en la membrana plasmática (MP) como en las membranas intracelulares de los adipocitos, mientras que GLUT-4 es un transportador sensible a insulina que en estado basal, es almacenado en vesículas intracelulares y cuya traslocación a la MP está mediada por la insulina a través de la vía fosfatidil inositol 3´cinasa (PI3K)/Akt (Bryant *et al.*, 2002; Grisouard *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011).

Los agonistas de PPAR- α han demostrado inhibir la expresión de citocinas tales como resistina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), que promueven la resistencia a la insulina. Además, estimulan la expresión de adiponectina, que en el caso de pacientes con DT2 y en los sujetos obesos se encuentra disminuida. La adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético e hígado, y disminuye la producción de glucosa en el hígado, lo que provoca la disminución en los niveles de ácidos grasos libres (FFAs), triglicéridos (TG) y de glucosa en circulación (Berger y Moller, 2002, Gross y Staels, 2007).

Experimentos realizados en cultivos de adipocitos y tejido adiposo humano en presencia de agonistas de PPAR- α han demostrado un incremento en la expresión

del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS-2), una proteína que participa en la vía de señalización desencadenada por la insulina (Berger y Moller, 2002; Gross y Staels, 2007).

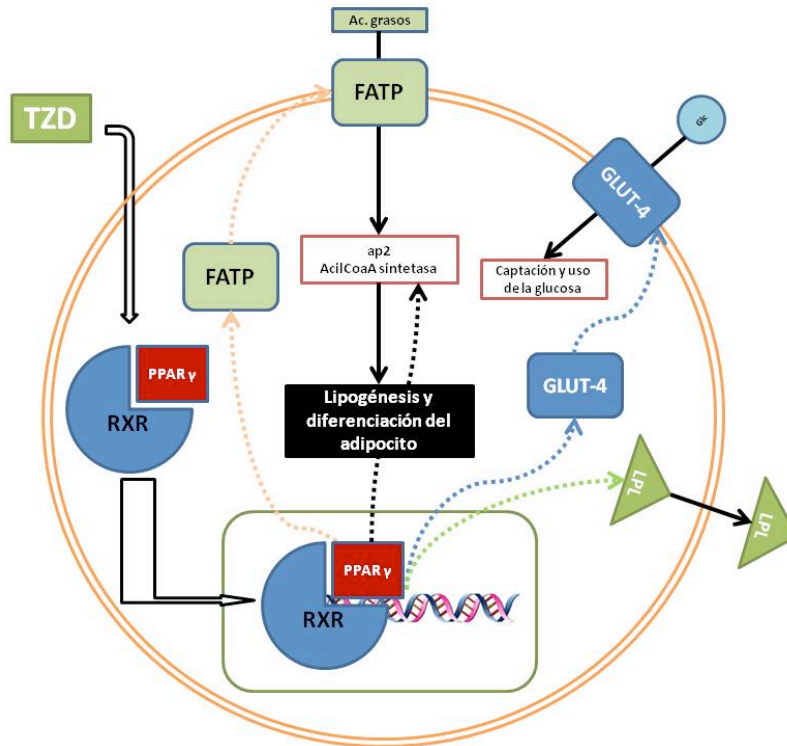


Figura 2. Las TZDs reducen la concentración de glucosa en sangre mediante la activación de PPAR- γ , que incrementa la expresión de enzimas involucradas en la lipogénesis. La reducción de los ácidos grasos libres en sangre lleva a la utilización de la glucosa vía el ciclo glucosa-ácido graso. Modificada de: Bailey *et al.*, 2000.

III.1.2.2. PPAR- α

PPAR alfa (PPAR- α), una isoforma de los PPARs, está relacionada con la captación, activación y oxidación de los ácidos grasos (Berger y Moller 2002, Takahashi *et al.*, 2002, Fiévet *et al.*, 2006, Haluzink y Haluzink 2006) e induce la expresión de la FATP y la ácido graso traslocasa (FAT), que transportan ácidos grasos a través de la membrana (Berger y Moller, 2002). Se ha demostrado que PPAR- α se expresa principalmente en tejidos que muestran un elevado catabolismo de ácidos grasos como el hígado, corazón, riñón, y músculo esquelético (Gross y Staels, 2007) y regula la sobreexpresión de enzimas que participan en la beta-oxidación (α -oxidación) como la isoforma 1 de la acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga (ACSL-1), acil-CoA oxidasa (ACO), enzima multifuncional enoil-CoA hidratasa/deshidratasa, y la cetoacil-CoA tiasa (Berger y Moller, 2002). Guerre-Millo y colaboradores demostraron que ratones ob/ob deficientes de leptina y ratas diabéticas Zucker, al ser sometidos a un estímulo por agonistas de PPAR- α , disminuyeron su grasa corporal, glucosa sanguínea, así como los niveles de insulina, por lo que los resultados sugieren una mejora en la sensibilidad a la insulina (Haluzzik MM y Haluzik M, 2006). Así mismo, PPAR- α tiene un importante papel en la regulación de la gluconeogénesis hepática a través del estímulo en la expresión de la piruvato deshidrogenasa 4, favoreciendo la utilización del piruvato por la vía gluconeogénica lo que lleva un descenso en la síntesis de los ácidos grasos (Gross y Staels, 2007). La activación de PPAR- α por medio de fibratos tales como gemfibrozil,

clofibrato, fenofibrato y ciprofibrato, lleva a una disminución en los niveles de triglicéridos (TG) en plasma y promueve un aumento de la lipoproteína de alta densidad (HDL-colesterol), como resultado del estímulo en la expresión de apolipoproteína AI (ApoAI) y apolipoproteína AII (ApoAII), principales apolipoproteínas que constituyen las HDLs. Aunado a esto, PPAR- α promueve la lipólisis de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), así como una reducción en su producción, además de estimular la captación y oxidación intracelular de ácidos grasos (FA) en hígado y músculo (Gross y Staels, 2007).

Mientras que los agonistas del PPAR- β , como las TZDs, aumentan la lipogénesis y la ganancia de peso corporal, que son inconvenientes para el tratamiento de pacientes con DT2. Se ha reportado que PPAR- β disminuye la ingesta de alimentos y los depósitos de grasa, los cuales fueron inducidos por el tratamiento con agonistas de PPAR- α (Fiévet *et al.*, 2006). La activación simultánea de PPAR- α y PPAR- β mediante compuestos agonistas duales produce una alteración en la distribución de los FFAs en los tejidos, estimulando su captación en el tejido adiposo, hígado y músculo esquelético (figura 3) (Fiévet *et al.*, 2006, Balakumar *et al.*, 2007).

De los agonistas duales estudiados hasta el momento, los pertenecientes a la clase glitazar han llegado a fase III de estudio clínico. El muraglitazar, un agonista dual (α/β) de la familia glitazar, al activar PPAR- α y PPAR- β mejora la hiperglucemia y el desorden en el metabolismo de lípidos, al reducir los TG e incrementar las HDL-colesterol en humanos (Kendall *et al.*, 2006). A pesar de los efectos benéficos sobre la homeostasis de la glucosa y lípidos, el estudio de estos compuestos se ha

detenido debido a los efectos adversos que mostraron en humanos, como insuficiencia cardiaca, edema y ganancia de peso; siendo estos dos últimos los más comunes (Fiévet et al., 2006).

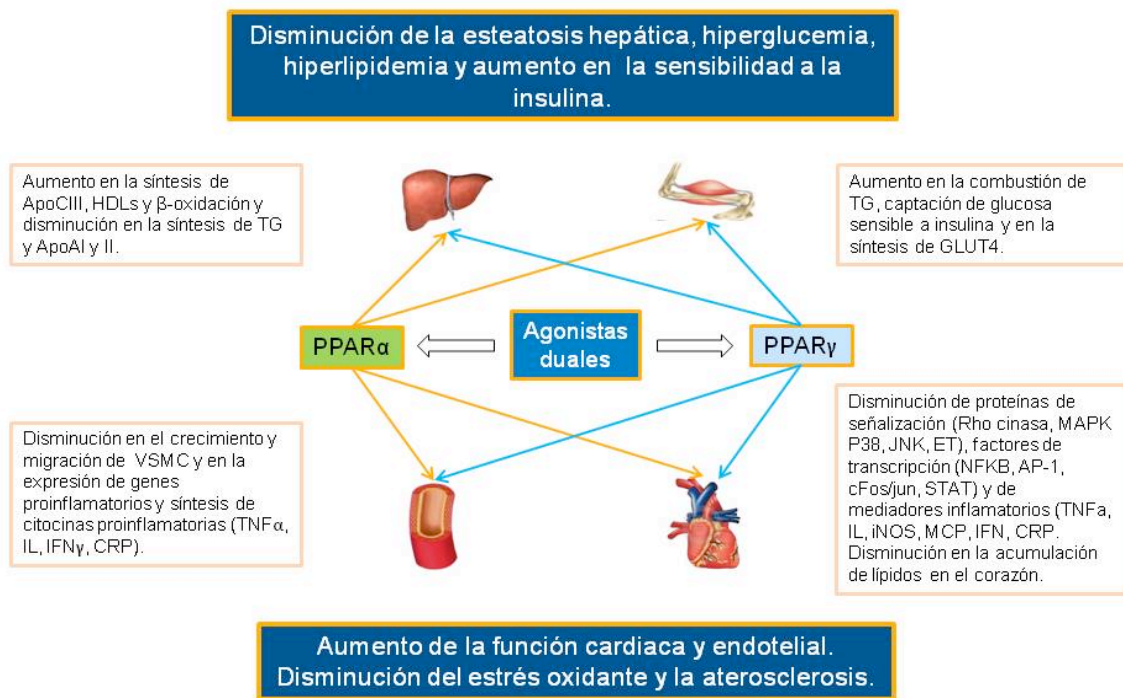


Figura 3. El efecto sinérgico ideal de agonistas duales de PPAR- α y PPAR- γ .
Modificada de Balakumar et al., 2007.

Por lo tanto, la búsqueda de agonistas altamente selectivos que combinen los efectos terapéuticos de PPAR- α y PPAR- γ y cuyos efectos secundarios se vean reducidos, lleva a la posibilidad de aumentar la eficacia en el tratamiento de la DT2 (Takahashi et al., 2002, Fiévet et al., 2006).

III.1.2.3. PPAR- α

El PPAR- α es otra isoforma de la familia de los PPARs y ha demostrado ser un regulador del metabolismo de lípidos induciendo la oxidación de los ácidos grasos (Gross B y Staels B, 2007, Kleiner *et al.*, 2009). El PPAR- α se expresa en el tejido adiposo blanco, corazón, músculo, intestino, placenta e hígado. Se sabe que tiene efectos importantes sobre el catabolismo de los ácidos grasos en el músculo esquelético y tejido adiposo, aunque se encuentra mayormente expresado en el músculo esquelético (Fredenrich y Grimaldi, 2004, Luquet *et al.*, 2005, Kleiner *et al.*, 2009). El catabolismo de los ácidos grasos en el músculo esquelético está dado por la regulación en la expresión de genes implicados en la combustión de ácidos grasos que produce un cambio en la composición de las miofibrillas hacia un fenotipo más oxidante. Por otra parte, se ha demostrado que los tejidos adiposos blanco y pardo están involucrados en la disminución de lípidos y en las acciones antidiabéticas de los activadores de PPAR- α . Se sabe que la activación de PPAR- α en adipocitos aumenta el metabolismo de ácidos grasos al igual que en el músculo esquelético (Figura 4), ejerciendo una acción de protección contra la obesidad inducida genéticamente o por cambios alimenticios (Fredenrich y Grimaldi, 2004, Luquet *et al.*, 2004, Luquet *et al.*, 2005).

La activación selectiva de PPAR- α por medio de agonistas muestra una mejora en el metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina en modelos de ratones con obesidad y resistencia a la insulina. Al parecer estos efectos están dados por su

capacidad de activar el transporte y oxidación de los ácidos grasos (Kleiner *et al.*, 2009). En experimentos hechos en monos *Rhesus* obesos con resistencia a la insulina, la administración GW 501516; un agonista de PPAR- α , durante 4 semanas incrementó los niveles de HDL-colesterol y disminuyó las concentraciones de la lipoproteína de baja densidad (LDL-colesterol), TG e insulina plasmática en ayunas. (Fredenrich y Grimaldi, 2004; Luquet *et al.*, 2005).

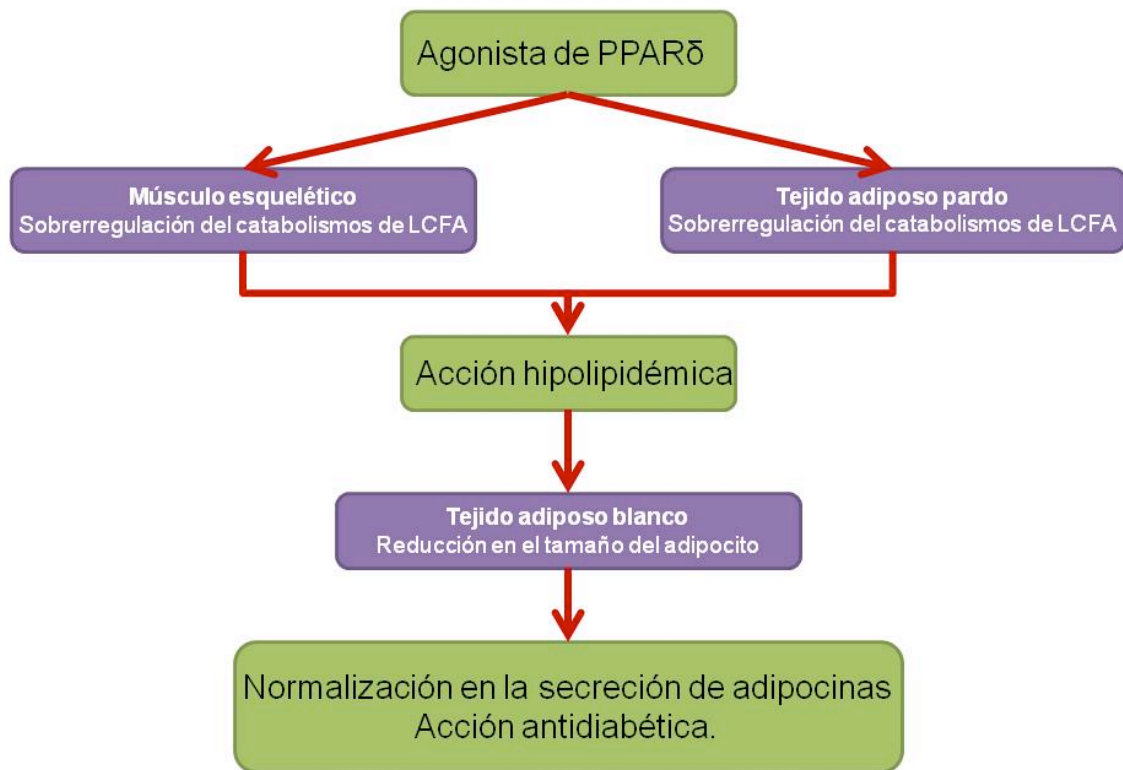


Figura 4. Modelo que ilustra los efectos de la activación de PPAR- α en el músculo esquelético y tejido adiposo y sus repercusiones en el parámetro metabólico. LCFA: ácidos grasos de cadena larga. Modificada de Luquet *et al.*, 2004.

III.1.3. GENERALIDADES DE *C. ficifolia*.

C. ficifolia es una hierba rastrera que puede llegar a medir hasta 10 m de largo, con zarcillos donde nacen hojas y flores. Los frutos son globosos, verdosos con amarillo pálido, la cáscara es dura y contienen abundantes semillas comprimidas. Habita en climas cálido y semicálido entre 200 y los 700 metros sobre el nivel del mar (msnm) (BDMTM, 2011). En México se conoce como chilacayote, cidra chayote o pequeña calabaza blanca (Patiño *et al.*, 2001, Alarcón *et al.*, 2002).



Figura 5. Fruto maduro de *C. ficifolia* Bouché.

Se han logrado purificar varias sustancias a partir de esta planta, entre las que destaca: tres lectinas de la raíz de esta especie vegetal (RLA(1), RLA(2), RLA(3)) y cuatro de su tallo (SLA(1), SLA(2), SLA(3), SLA(4)) (Andrade y Heinrich, 2005). Xia y Wang (2006) demostraron que el fruto de *C. ficifolia* tiene elevadas concentraciones de D-QI, un compuesto químico que induce un efecto hipoglucémico en ratas. Sin

embargo, se ha observado que los compuestos puros aislados de esta planta pierden actividad biológica, quedando de manifiesto la posibilidad de un sinergismo entre varias sustancias que producen su efecto farmacológico.

Uno de los primeros trabajos que demostraron la capacidad hipoglucemiante de esta planta fue el realizado por Román y colaboradores, quienes probaron extractos de *C. ficifolia* junto con otras once especies vegetales en conejos, utilizando como controles tobultamina y agua, observando un efecto hipoglucémico pronunciado (Román *et al.*, 1991). Investigaciones subsecuentes pusieron en evidencia que *C. ficifolia* disminuye los niveles de glucosa en ratas con diabetes inducida mediante estreptozotocina (STZ) (Xia y Wang, 2006), así como en ratones CD-1 y ratas Wistar con diabetes inducida por medio de aloxana (Alarcón *et al.*, 2002). Agregado a esto, se ha demostrado que tiene el mismo efecto en pacientes con DT2 con una hiperglucemia moderada (Patiño *et al.*, 2001). La administración oral del extracto de *C. ficifolia* con un contenido de 10 ó 20 mg de D-QI por Kg de peso corporal durante 30 días en ratas con diabetes inducida con STZ, disminuyó significativamente los niveles de glucosa e incrementó las concentraciones de glucógeno hepático, insulina plasmática y hemoglobina (Xia y Wang, 2010).

En un trabajo reciente realizado por nuestro grupo de investigación se observó que el tratamiento con *C. ficifolia* en ratones diabéticos promueve el aumento de la expresión de PPAR- α en hígado, así como una disminución de triglicéridos en sangre (Ramírez H, 2011).

Es importante mencionar que aún a pesar de los antecedentes que respaldan el efecto hipoglucémico del fruto de *C. ficifolia*, aún se desconocen el o los posibles mecanismos de acción, y los indicios donde se muestra que aumenta la expresión de PPAR- α en el hígado de ratones con diabetes inducida mediante STZ abre la posibilidad de que, además, promueva la transcripción y síntesis de enzimas que participan en el metabolismo de lípidos, así como de transportadores de glucosa y ácidos grasos, no solo en el tejido hepático, sino también en el tejido adiposo.

III.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con la última edición del Atlas de Diabetes publicado por la Federación Internacional de Diabetes (o IDF, por sus siglas en inglés), en el 2011 el número de personas con este padecimiento fue de 366 millones, que representa el 6.4 % de la población adulta en el mundo (IDF, 2011) y se espera que para el 2030, el número ascienda a más de 552 millones (OMS, 2011 e IDF, 2011).

En México existen alrededor de 6.5 millones de personas con diabetes, que representa el 10.1% de su población de 20 a 79 años. Esto coloca al país en el décimo lugar a nivel mundial y se espera que para el 2030 ocupe el séptimo, con el 12.9% de la población con problemas de diabetes. En el 2009 se reportaron 24 994 defunciones de hombres de 20 a 79 años de edad a causa de esta enfermedad; mientras que en el caso de mujeres, el número ascendió a 29 898 defunciones, lo

que coloca a este padecimiento como la principal causa de muerte en el país (FMD, 2011 e IDF, 2011). Además de las elevadas cifras de mortalidad, la diabetes representa la principal demanda de atención médica en consulta externa, es la razón principal de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas (alrededor de 20%) (SSA, 2007). Se ha estimado que el gasto sanitario por persona es de al menos ocho mil pesos anuales (FMD, 2011). A pesar de la terapia farmacológica que existe para el tratamiento de la diabetes, la población recurre al uso de plantas medicinales para el tratamiento de la enfermedad.

Puesto que los antecedentes ponen en evidencia el efecto hipoglucémico del extracto acuoso de *C. ficifolia* en modelos *in vivo*, es importante determinar como influye sobre los patrones de expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos y glucosa mediante la activación de los PPARs, lo que nos puede conducir a su posible mecanismo de acción.

IV. JUSTIFICACION

A pesar de los estudios que demuestran el efecto hipoglucemiante de *C. ficifolia* en diferentes modelos *in vivo*, aún se desconocen el o los posibles mecanismos de acción mediante los cuales se logra la disminución de los niveles de glucosa en sangre. De acuerdo con los antecedentes, los PPARs permiten una mejora en la

sensibilidad a la insulina al regular la síntesis de la FATP-1 así como de GLUT-1, GLUT-4, y regulando la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos como la acetil-CoA sintetasa y adiponectina, en hígado y tejido adiposo.

Por lo tanto, el presente trabajo está encaminado a determinar si *C. ficifolia* promueve la expresión de cualquiera de las tres isoformas conocidas de la familia de receptores PPARs; así como su participación en la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de glucosa y ácidos grasos en hepatocitos y adipocitos, células que componen los órganos blanco de estos receptores.

Lo anterior respaldará el uso de esta especie vegetal en la MT mexicana para el tratamiento de la diabetes, abriendo la posibilidad del desarrollo de fármacos agonistas para estos receptores.

V. HIPÓTESIS

El extracto acuoso hipoglucemiante del fruto de *C. ficifolia* posee compuestos que actúan como agonistas de PPARs, induciendo modificaciones en el patrón de expresión de los genes que codifican para acetil-CoA sintetasa, transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4, FATP-1 y adiponectina, y alterando el metabolismo de la glucosa y ácidos grasos.

VI. OBJETIVOS

VI.1. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que *C. ficifolia* modifica el metabolismo de la glucosa y lípidos a través de aumento en la expresión de PPARs.

VI.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estandarizar y caracterizar el extracto acuoso de *C. ficifolia*.
- ❖ Determinar la influencia de un extracto acuoso hipoglucemiante de *C. ficifolia* sobre la expresión del RNAm de PPAR- α , PPAR- β y PPAR- γ en adipocitos (3T3-L1) y en hepatocitos (HepG2).
- ❖ Determinar el efecto del mismo extracto sobre la activación de PPAR- α , PPAR- β y PPAR- γ en estas líneas celulares.
- ❖ Determinar si este extracto acuoso de *C. ficifolia* modifica la expresión de acetil-CoA sintetasa, transportadores de glucosa (GLUT-1 y GLUT-4), FATP-1 y adiponectina en ambas líneas celulares.

VII. METODOLOGÍA CIENTÍFICA

VII.1. MATERIAL VEGETAL

El fruto de *C. ficifolia* fue colectado en el municipio de Acolman, Estado de México. La identificación botánica de la especie se realizó por medio del cotejo de ejemplares de herbario (Herbario-IMSSM, Herbario-MEXU y Herbario-UAMI) y mediante claves taxonómicas con ayuda de especialistas en la materia (11119).

VII.2. OBTENCION DEL EXTRACTO

Para la obtención de los extractos se siguió la misma metodología reportada en estudios previos (Alarcón-Aguilar *et al.*, 1997; Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002a). Cabe señalar que esta metodología ya ha sido validada en nuestro laboratorio obteniendo extractos con actividad hipoglucemiante.

El fruto de *C. ficifolia*, sin cáscara, libre de bagazo y semillas, se cortó en rebanadas delgadas y se colocó en un recipiente para su deshidratación a temperatura ambiente y con aireación constante. El material seco fue triturado en un molino eléctrico marca Wiley, usando una rejilla de 1 mm de diámetro. Este material (400 g) posteriormente fue sometido a una maceración con agua (4 L) durante 72 h dentro de una campana de flujo laminar. La fase acuosa se filtró y centrifugó a 805 x g para obtener un precipitado, el cual fue separado y liofilizado. Este procedimiento se

repitió en tres ocasiones con el mismo residuo de la planta cada 24 h. El producto liofilizado se utilizó en los experimentos correspondientes.

El extracto obtenido fue almacenado en un frasco debidamente etiquetado, sellado y puesto en un lugar seco a -70 °C.

VII.3. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO

El extracto de *C. ficifolia* se caracterizó con base en el contenido de D-QI mediante HPLC. Para ello se utilizó una columna de amino con un detector de arreglo de diodos, usando como vehículo CH₃CN/H₂O en una proporción 8:2. Así mismo, se cuantificaron también otros compuestos, como: azúcares totales, polifenoles totales y proteínas totales.

VII.4. LAS LINEAS CELULARES HepG2 Y 3T3-L1

La línea celular HepG2 proviene de un hepatoblastoma humano. La línea 3T3-L1 proviene de fibroblastos de ratón Swiss 3T3, que con la adición de determinados compuestos puede diferenciar hacia adipocitos (proceso detallado en la metodología). Existen antecedentes donde algunos isoprenoles (geraniol, farnesol y geranilgeraniol) muestran una acción dual en la expresión de PPAR- α y PPAR- γ en

células 3T3-L1 y HepG2 respectivamente, regulando la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos (Takahashi *et al.*, 2002). En otros estudios han utilizado la línea de 3T3-L1 para demostrar que PPAR- α está involucrado en la diferenciación hacia adipocitos maduros, ya que su activación promueve la traslocación de los transportadores GLUT-1 y GLUT-4, lo que permite la entrada de glucosa y su almacenamiento en forma de TG. También estimula la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y en mecanismos de sensibilización a la insulina (Choi *et al.*, 2011, Berger y Muller, 2002, Kim *et al.*, 2011, Suggi *et al.*, 2009). La influencia de PPAR- α y PPAR- β en el metabolismo lipídico y glucosa se ha desarrollado principalmente en modelos *in vivo*, utilizando hígado, musculo esquelético y tejido adiposo como objeto de estudio (Cree *et al.*, 2007, Fiévet *et al.*, 2006, Fredenrich y Grimaldi, 2004, Kleiner *et al.*, 2009, Lim *et al.*, 2009, Luquet *et al.*, 2004, Luquet *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2008)

El utilizar estas líneas celulares como modelo de estudio, nos permitirá una manipulación más efectiva al disminuir las variables que agrega un modelo *in vivo*, con la finalidad de observar la expresión y activación de proteínas que participan en el metabolismo de lípidos y glucosa en células que componen el tejido hepático y adiposo.

Las líneas celulares son una herramienta útil para seleccionar los extractos con el mayor potencial hipoglucémico y determinar el o los posibles mecanismos de acción no solo de los extractos completos como es el caso del extracto acuoso de C.

ficifolia; sino también, de los compuestos que posiblemente estén proporcionando el efecto deseado al extracto vegetal como por ejemplo el D-quirositol (D-QI).

VII.5. ENSAYO DE FUNCIONALIDAD CELULAR

El ensayo de funcionalidad aplicado a las líneas celulares HepG2 y 3T3-L1 se realizó mediante el uso del kit CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; distribuido por Promega.

Esta técnica se basa en el uso del MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxyfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS], un compuesto que al ser reducido se transforma en formazán (Figura 6). Esta reducción está relacionada con la actividad de las enzimas deshidrogenas en las células. La concentración del formazán producido se midió a una absorbancia de 490 nm y fue proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo.

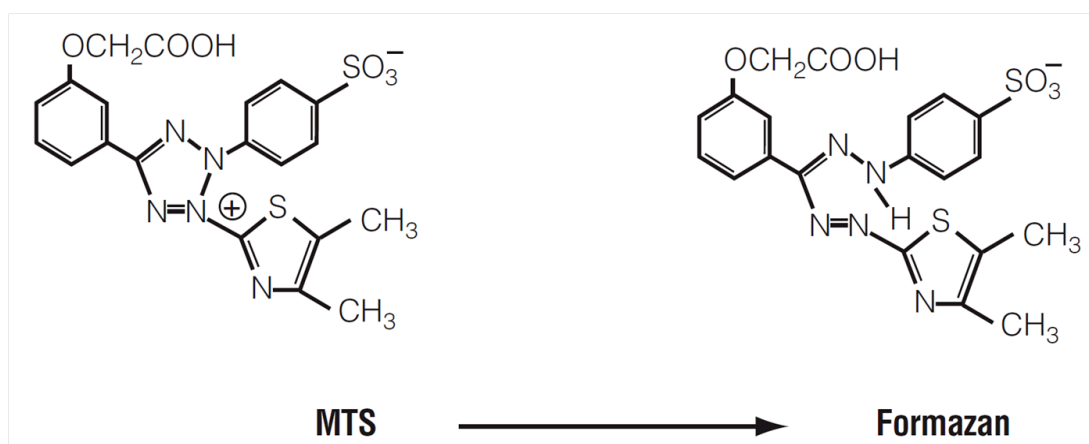


Figura 6. Estructura química de MTS y formazán.

Para la prueba de funcionalidad de adipocitos y hepatocitos se emplearon siete concentraciones del D-QI contenido en el extracto de *C. ficifolia* o del compuesto sintético, que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de D-QI contenido en el extracto de *C. ficifolia* o del D-QI sintético aplicadas a los cultivos celulares de las líneas HepG2 y 3T3-L1.

Concentraciones (mM)						
1	2	3	4	5	6	7
0.019	0.038	0.078	0.125	0.250	0.5	0.78

Los resultados de funcionalidad se expresaron en porcentaje \pm EEM y se consideraron las concentraciones donde la funcionalidad fue cercana al 100% (gráficos 1 y 2).

El análisis estadístico se llevo a cabo mediante el uso del paquete estadístico Graph Pad Prism 4.0 con la finalidad de observar si existían diferencias significativas en la funcionalidad de las células incubadas con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *C. ficifolia* (con base en su contenido de D-QI) y poder así determinar la dosis más adecuada para el tratamiento.

VII.6. EXPERIMENTOS EN CULTIVOS CELULARES DE HEPATOCITOS HepG2.

La línea celular HepG2 que proveniente de un hepatoblastoma humano (Figura 7) se adquirió comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). Las células HepG2 fueron mantenidas en medio Williams (sigma, St Louis, MO) suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB, Hy-Clone, Logan, UT, EUA), 100 U/mL penicilina y 100 µL estreptomina (Microlab). A este medio se le llamó medio completo. Las células se sembraron en botellas de cultivo de plástico estériles (Corning, Acton, MA, EUA) y se les cambió el medio de cultivo cada tercer día. Las células se desprendieron con tripsina al 0.25 % y EDTA 0.2 M (sigma) y se resembraron a una dilución 1:3 en botellas de cultivo una vez a la semana. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera del 5 % de CO₂ y 95 % de humedad a una temperatura de 37 °C. Todos los experimentos se llevaron a cabo cuando las células se encontraban en fase de crecimiento logarítmica.

Las células HepG2 se trataron por 24 horas con el extracto acuoso de *C. ficifolia* con un contenido de D-QI de 0.078 mM, y con los diferentes compuestos mostrados en la tabla 2.

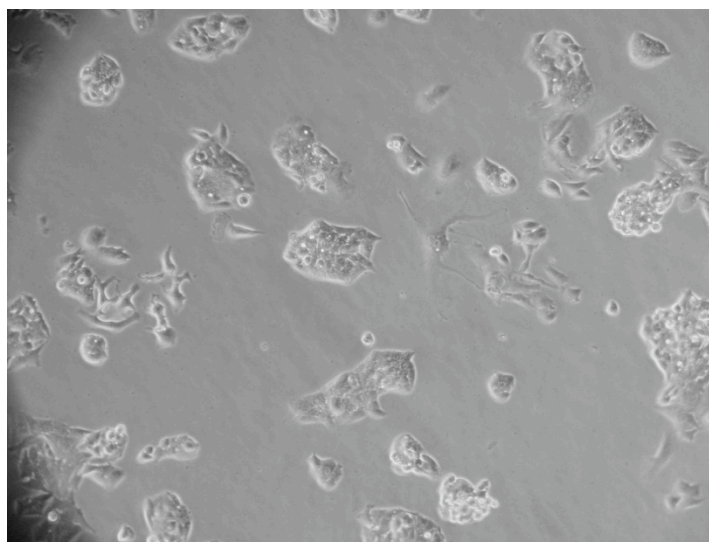


Figura 7. Células de la línea celular HepG2.

Tabla 2. Concentraciones empleadas para el tratamiento de las células HepG2.

Concentración	
Control	Medio de cultivo
<i>C. ficifolia</i>	0.078 mM
D-QI	0.078 mM
Fenofibrato (Agonista de PPAR-α)	100 μM
Pioglitazona (Agonista de PPAR-γ)	10 μM

Después de transcurridas 24 horas de tratamiento, procedimos a la extracción de RNA de los cultivos celulares por el método de trizol. A partir del RNA obtenido se preparó el cDNA y posteriormente se procedió a la realización de la PCR en tiempo real.

VII.7. EXPERIMENTOS EN CULTIVOS CELULARES DE ADIPOCITOS 3T3-L1

La línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-L1 (Figura 8) se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO) con 10% de suero de ternera y glucosa 25.5 mM, en botellas de cultivo de 75 cm a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los adipocitos se diferenciaron a partir de fibroblastos precursores conocidos como preadipocitos. Los fibroblastos de la línea 3T3-L1 de ratón se cultivaron a confluencia a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ en placas de cultivo con medio DMEM (8 X 10⁵ células por pozo), con glucosa 25.5 mM, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (0.1 mM), gentamicina (20 µg/mL), complementado con 10% de suero fetal bovino. Dos días después de la confluencia (día 0), la diferenciación de fibroblastos a adipocitos se propició con metilhidroxibutilxantina (MIX, 0.5 mM), dexametasona (DX, 0.25 µM) e insulina (5 µg/mL) en DMEM con 10% de suero fetal bovino (Figura 9). Al segundo día se cambió el medio adicionado con insulina (5 µg/mL), sin MIX, sin DX y se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio sin suplemento de insulina se reemplazó cada dos días. Las células se usaron al octavo día de diferenciación (Fashauer *et al.*, 2001).

Las células 3T3-L1 se trataron por 24 horas con el extracto acuoso de *C. ficifolia* con un contenido de D-QI de 0.078 mM, y con los diferentes compuestos mostrados en la tabla 3.

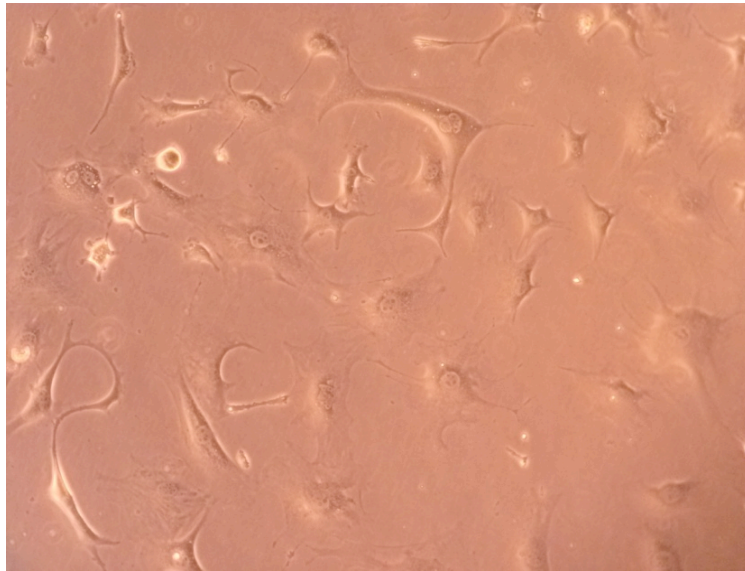


Figura 8. Fibroblastos de la línea celular 3T3-L1.

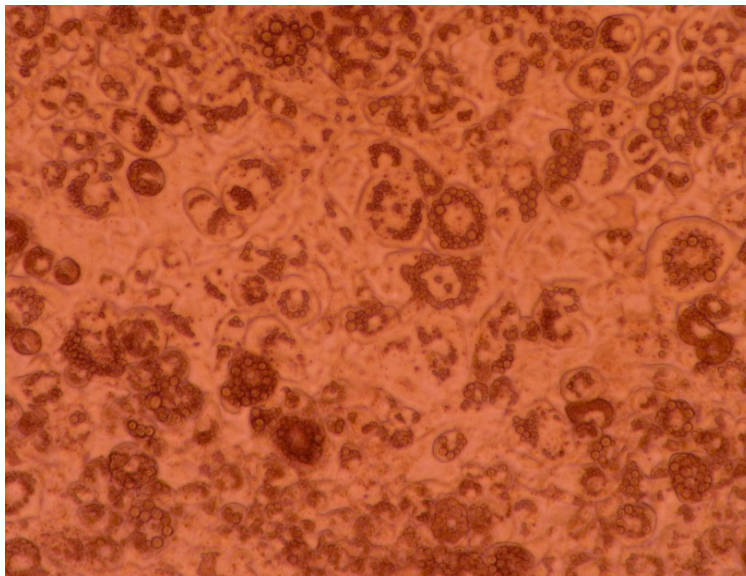


Figura 9. Adipocitos al octavo día de diferenciación, en los cuales se observan las vesículas de grasa en el interior de las células.

Tabla 3. Concentraciones empleadas para el tratamiento de los adipocitos 3T3-L1.

	Concentración
Control	Medio de cultivo
<i>C. ficifolia</i>	0.078 mM
D-QI	0.078 mM
L-165041 (Agonista de PPAR- δ)	1 μ M
Pioglitazona (Agonista de PPAR- γ)	10 μ M

Después de transcurridas 24 horas de tratamiento, procedimos a la extracción de RNA de los cultivos celulares por el método de trizol. A partir del RNA obtenido se preparó el cDNA y se procedió a realizar la PCR en tiempo real.

VII.8. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESION DE RNAs MENSAJEROS.

El RNA total se obtuvo mediante el método de trizol, el cuál se basa en el uso de una solución monofásica constituida por fenol, isotiocianato de guanidina, y otros componentes que facilitan la ruptura de la membrana plasmática y el aislamiento del RNA de alto y bajo peso molecular.

Después de homogeneizar las células en el trizol se agregó el cloroformo, que permitió la formación de una fase superior clara que contenía el RNA, una interfase,

y una fase inferior roja que en la que se encontraban DNA y proteínas. Posteriormente, una vez aislada la superficie superior, el RNA total se precipitó mediante isopropanol.

El RNA total obtenido, fue cuantificado haciendo uso del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y posteriormente sometido a la reacción de transcripción en reversa.

La reacción de transcripción en reversa (RT) se llevó a cabo para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa (Estuche ImProm II de Promega) a partir de 2 μ g de RNA total de las células; también se utilizaron iniciadores al azar (random primers 0.5 μ g/ μ L). Un volumen total de 20 μ L de reacción se incubó en el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700, con el siguiente programa de ciclos: inicio 25°C por 5 min, seguido por la extensión a 42°C por 55 min y, por último, se detuvo la reacción inactivando la enzima calentando a 70°C por 15 min y enfriando a 4°C por 5 min.

El cDNA se amplificó mediante la enzima DNA polimerasa del kit de “DNA master SYBR Green 1” para cada uno de los genes a estudiar. Para el análisis de expresión en células HepG2 se utilizaron cebadores diseñados a partir de secuencias de genes *Homo sapiens* que se describen en la tabla 4, utilizando como gen constitutivo la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). En el caso de la línea 3T3-L1 se utilizaron cebadores diseñados a partir de secuencias de genes de *Mus musculus*

que se describen en la misma tabla. En este caso utilizamos 36B4 como gen constitutivo.

Una vez diseñados y adquiridos los cebadores (tabla 4), realizamos la estandarización de las concentraciones de los cebadores y de $MgCl_2$ y de las condiciones de la PCR en tiempo real.

El proceso de amplificación se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo Rotor Gene 3000 (Corbett Research). La mezcla de reacción con un volumen final de 10 μL estuvo compuesta por oligonucleótidos 0.5mM de los genes descritos previamente y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y $MgCl_2$ 3.5 mM. Las condiciones bajo las cuales se realizó esta reacción fueron las siguientes: desnaturalización; 95°C 10 seg. alineamiento 61°C 7 seg. y elongación; 71°C por 10 seg.

Para la comprobación del producto de PCR así como para verificar las condiciones de la reacción y la especificidad de los cebadores realizamos una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Figuras 10 y 11).

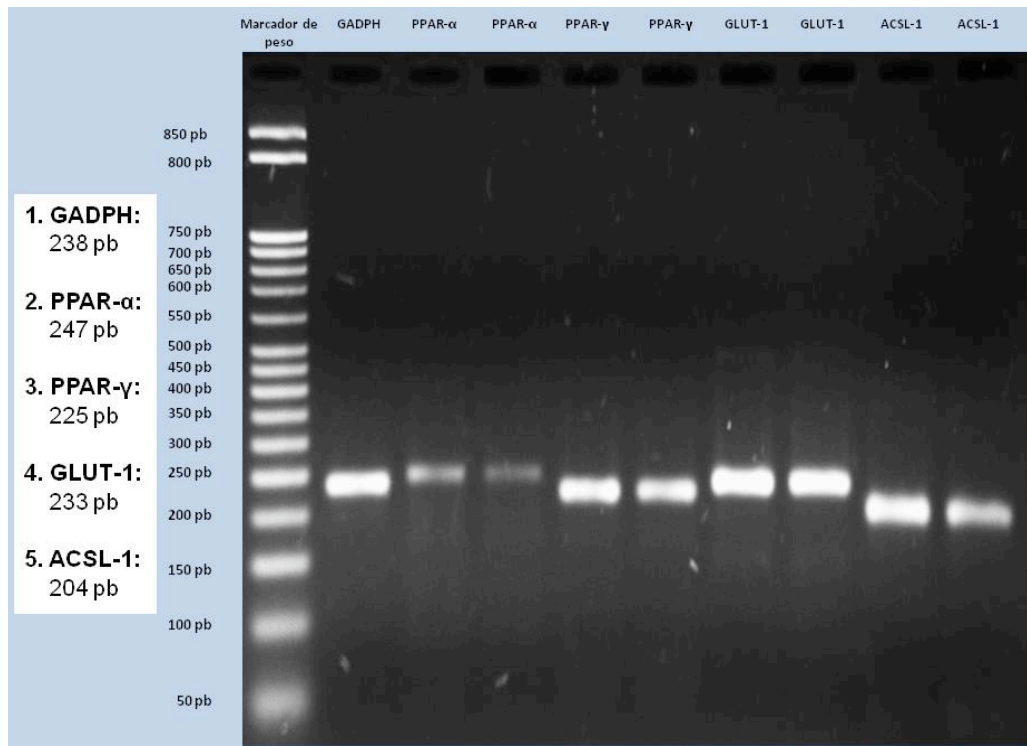


Figura 10. Corrimiento electroforético de los productos de PCR en tiempo real en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en donde se aprecian las bandas correspondientes al marcador de peso molecular, PPAR- α , PPAR- γ , ACSL-1, GLUT-1, FATP1 y el gen constitutivo GADPH. pb: pares de bases.

Las bandas corresponden al número de pares de bases reportadas para los amplicones de cada uno de los genes de estudio en la línea HepG2 (figura 10) y 3T3-L1 (figura 11), lo que indica que los procedimientos de extracción, RT-PCR y PCR-tiempo real se realizaron de manera correcta. Los cebadores y las condiciones a las cuales fueron sometidos los productos permitieron la amplificación específica de los genes de interés.

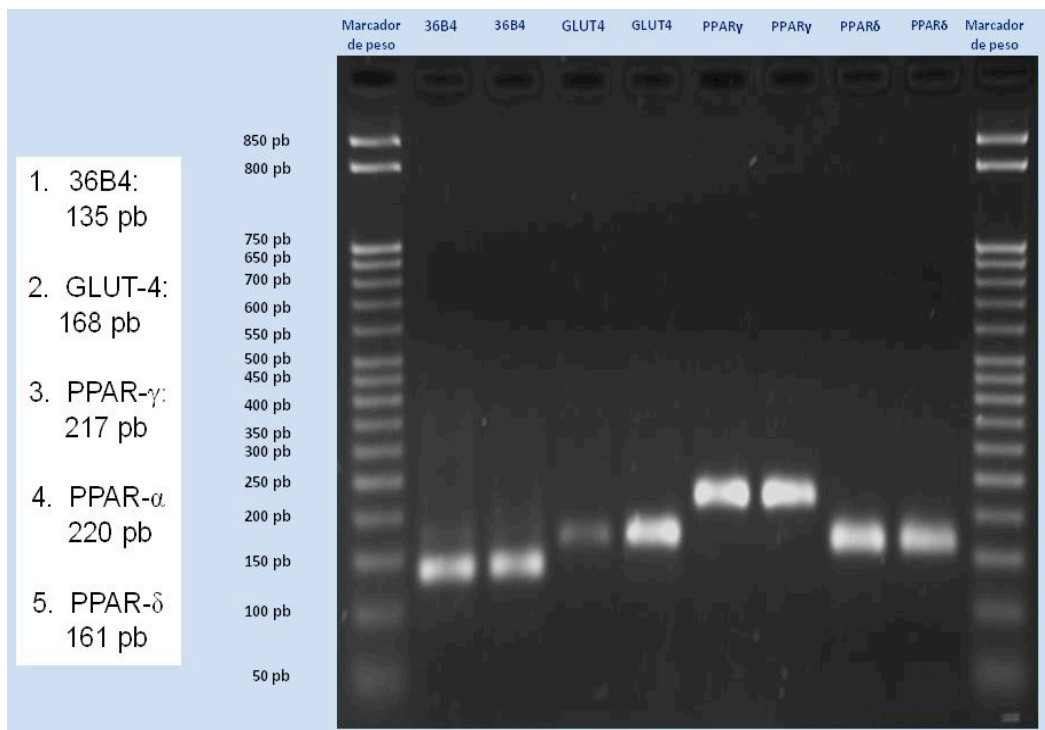


Figura 11. Corrimiento electroforético de los productos de PCR en tiempo real en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se aprecian las bandas correspondientes al marcador de peso molecular, así como el producto de amplificación de GLUT-4, PPAR- α , PPAR- γ y el gen constitutivo 36B4. pb: pares de bases.

Para el análisis estadístico se empleó el programa Graph Pad Prism 4.0 con la finalidad de observar si existían diferencias significativas entre los niveles de expresión relativa entre los grupos control y los tratados. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA y se empleo la prueba de Tuckey Kramer como comparativa.

Tabla 4. Características de genes y cebadores utilizados para el análisis de expresión en células HepG2 y 3T3-L1.

Genes HepG2	Primer forward	Primer reverse	pb
GADPH Gene Bank AF261085.1	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238
PPAR-α Gene Bank NM_001001928.2	GTTTGAGGGGGTAAACAGCAA	GCTAACTGCAGAGGGTGAGG	247
PPAR-γ Gene Bank NM_138712.3	GCTGTGCAGGAGATCACAGA	GGGCTCCATAAAGTCACCAA	225
GLUT-1 Gene Bank NM_006516.2	TCACTGTGCTCCTGGTTCTG	CCTGTGCTCCTGAGAGATCC	233
ACSL-1 Gene Bank NM_001995.2	CCAGAAGGGCTTCAAGACTG	GCCTTCTCTGGCTTGCAAC	204
FATP-1 Gene Bank NM_198580.1	CCACTTGGATGTCACCACTG	GTGGGACCCCTCCAGTAGACA	178
Genes 3TL-1	Primer forward	Primer reverse	pb
36B4 Gene Bank NM_007475.2	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT	CCGCAGGGGCAGCAGTGGT	135
PPAR-δ Gene Bank NM_011145	TGGAGCTCGATGACAGTGAC	GTA CTGGCTGTCAGGGTGGT	161
PPAR-γ Gene Bank NM_011146.1	CCAGAGTCTGCTGATCTGCG	GCCACCTCTTTGCTCTGCTC	217
GLUT-4 Gene Bank NM_009204.2	GATTCTGCTGCCCTTCTGTC	ATTGGACGCTCTCTCTCCAA	168
FATP-1 Gene Bank NM_011977.3	ACCAGTGTCCAGGGGTACAG	TGTCTCCCAGCTGACATGAG	174
Adipo Q Gene Bank NM_009605.4	GGCTCTGTGCTCCTCCATCT	AGAGTCGTTGACGTTATCTGCATAG	101

VIII RESULTADOS

VIII.1. FUNCIONALIDAD EN LA LINEA CELULAR HepG2

De acuerdo con el análisis estadístico de los resultados de funcionalidad, encontramos que no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones del extracto acuoso incluidas en el estudio (gráfico 1 y tabla 5).

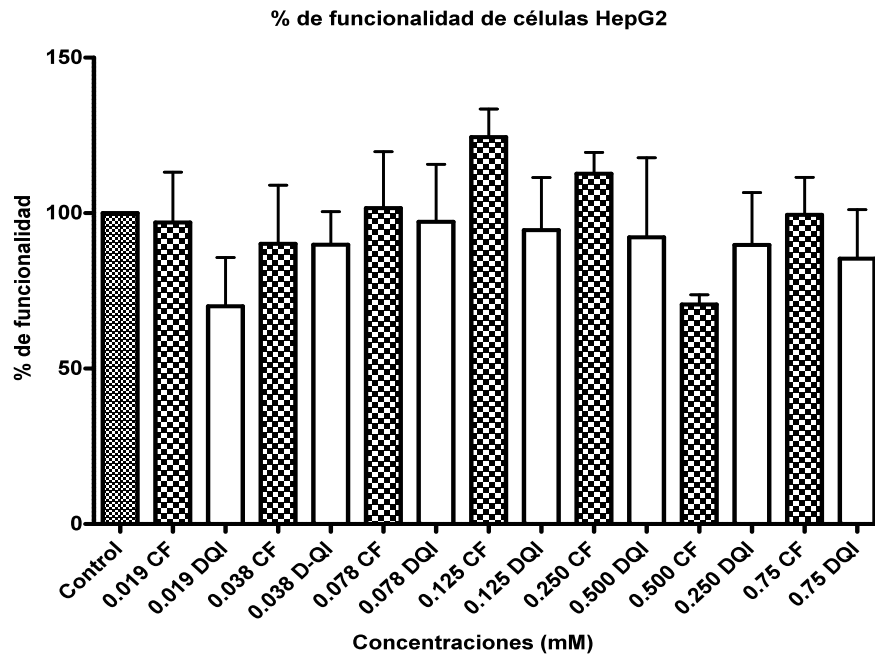


Gráfico 1. Porcentajes de funcionalidad de la línea celular HepG2 después del tratamiento con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *C. ficifolia*. (Cf) y del D-quirosinosis (D-QI). Los valores corresponden a la media \pm EEM, n=6.

Tabla 5. Porcentajes de funcionalidad correspondientes después del tratamiento de la línea celular HepG2 con el extracto acuoso de *C. ficifolia*.

Concentraciones de D-QI (mM).	0.019	0.038	0.078	0.125	0.025	0.5	0.75
% de funcionalidad celular	97.02	90.14	101.60	124.48	112.68	70.60	99.47

[†]ANOVA de medias repetidas. EEM. ns $p > 0.05$ (n=6). Los valores corresponden al gráfico 1.

El análisis estadístico de la funcionalidad correspondiente al tratamiento con D-QI mostró que no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones utilizadas (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de funcionalidad correspondientes al D-QI.

Concentraciones D-QI (mM).	0.019	0.038	0.078	0.125	0.025	0.5	0.75
% de funcionalidad celular	70.03	89.85	97.20	94.57	89.79	92.21	85.37

[‡]ANOVA de medias repetidas. EEM. ns $p > 0.05$ (n=6). Los valores corresponden al gráfico 1.

A partir de los resultados anteriores, se consideró la concentración 0.078 mM como la óptima para proceder al siguiente objetivo del trabajo que corresponde a la aplicación de los tratamientos y, posteriormente, a la obtención del RNA total y

cuantificación del RNAm de PPAR- α , y PPAR- β , así como de GLUT-1, ACSL-1 y FATP-1.

VIII.2. FUNCIONALIDAD EN LA LINEA CELULAR 3T3-L1

Los resultados de las absorbancias se expresaron como porcentajes de funcionalidad \pm EEM cuyos valores se muestran en el gráfico 2.

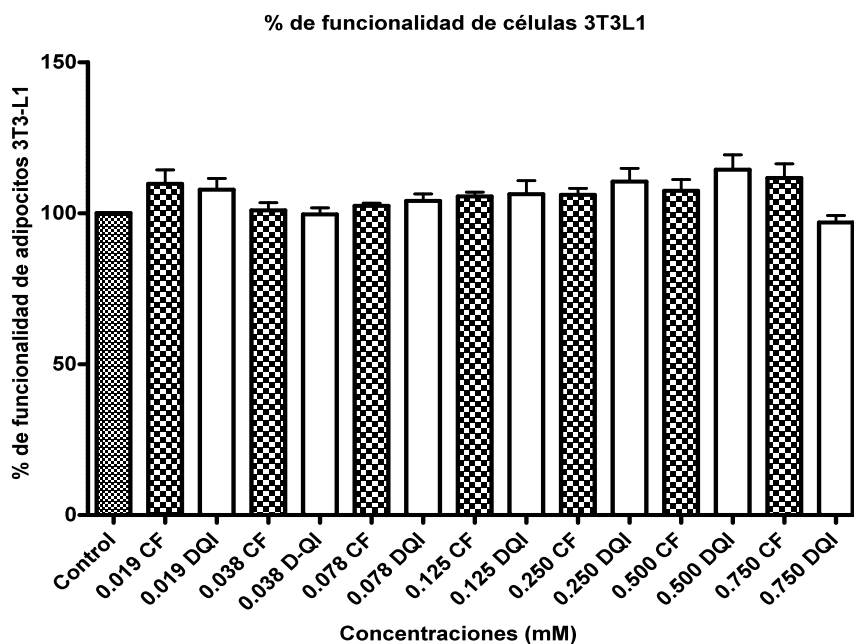


Gráfico 2. Porcentajes de funcionalidad de la línea celular 3T3-L1 después del tratamiento con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *C. ficifolia*. (Cf) y del D-quirositol (D-QI). Los valores corresponden a la media \pm EEM, n=6.

De acuerdo con el análisis estadístico para los porcentajes de funcionalidad correspondientes a las concentraciones encontramos que no existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones del extracto acuoso incluidas en el estudio (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de funcionalidad de las células 3T3-L1 después del tratamiento con distintas concentraciones del extracto acuoso de *C.ficifolia*.

Concentraciones de D-QI (mM).	0.019	0.038	0.078	0.125	0.025	0.5	0.78
% de funcionalidad celular	109.74	100.91	102.42	105.56	106.01	107.42	110.04

†ANOVA de medias repetidas. EEM. ns $p > 0.05$ (n=6). Los valores corresponden al gráfico 2

El análisis estadístico referente a los porcentajes de funcionalidad de las células con D-QI también mostró que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de funcionalidad con las distintas concentraciones empleadas (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de funcionalidad de las células 3T3-L1 tratadas con diferentes concentraciones de D-QI.

Concentraciones de de D-QI (mM).	0.019	0.038	0.078	0.125	0.025	0.5	0.78
% de funcionalidad celular	107.80	99.60	104.08	106.28	110.47	114.42	96.69

‡ANOVA de medias repetidas. EEM. ns $p > 0.05$ (n=6). Los valores corresponden al gráfico 2

Con base en el estudio estadístico, utilizamos la concentración 0.078 mM para la aplicación de los tratamientos y continuar con el siguiente objetivo del trabajo que corresponde a la aplicación de los tratamientos, y la consecuente obtención y cuantificación de los RNAs mensajeros de PPAR- α , PPAR- β , GLUT-4, FATP-1 y adiponectina.

VIII.3. CUANTIFICACIÓN DE RNAm DE PPAR- α , PPAR- γ , ACSL-1, GLUT-1 Y FATP-1 EN CÉLULAS HepG2.

Una vez estandarizada la técnica para la realización de la PCR en tiempo real, procedimos a la cuantificación de la expresión de los RNAs mensajeros previamente seleccionados, haciendo triplicados por cada uno de los tratamientos. La cuantificación se realizó por medio de PCR-tiempo real como se indicó en la metodología. Los resultados de expresión relativa se muestran a continuación:

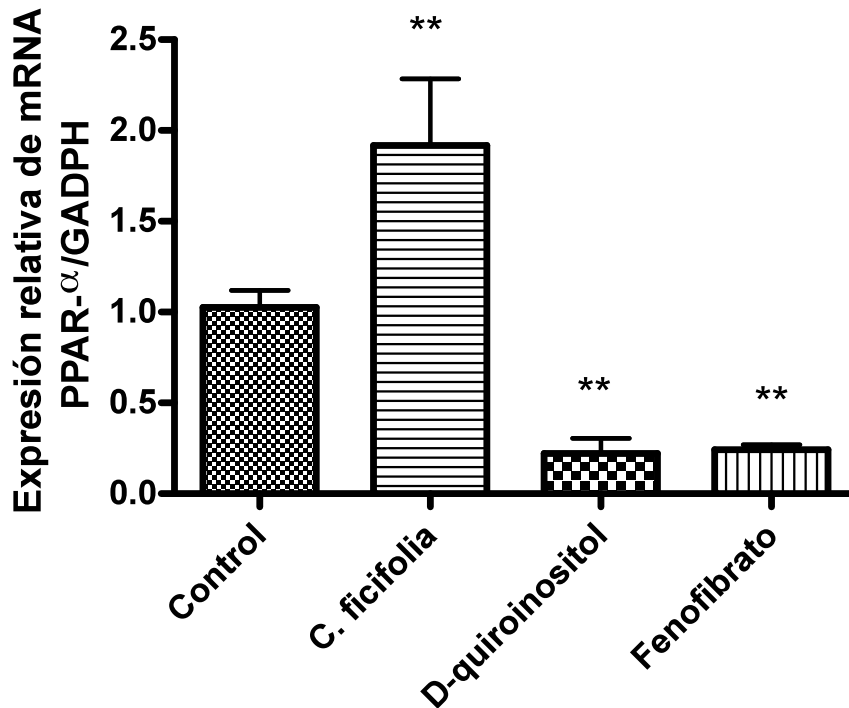


Gráfico 3. Expresión del RNAm de PPAR- α en células HepG2 tratadas con *C. ficifolia*, D-QI y fenofibrato por 24 horas. Los datos corresponden a la media \pm EEM, analizados con la prueba ANOVA. n= 6. **p<0.05.

Las células HepG2 tratadas con el extracto acuoso de *C. ficifolia* mostraron un aumento significativo en la expresión del RNAm de PPAR- α en comparación con el control. En los tratamientos con D-QI y fenofibrato la expresión del RNAm disminuyó significativamente en comparación con el control (gráfico 3).

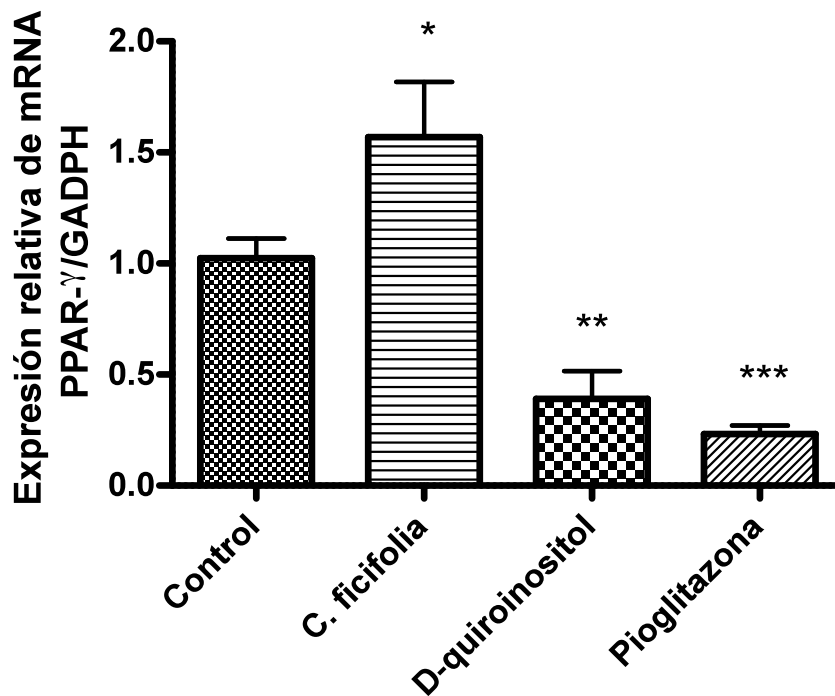


Gráfico 4. Expresión de RNAm de PPAR- α en células HepG2 tratadas con *C. ficifolia*, D-QI y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. *p<0.05, **p<0.05, ***p<0.05.

Las células HepG2 tratadas con el extracto acuoso mostraron incremento significativo en la expresión de PPAR- α en comparación con el control; mientras que

las tratadas con D-QI y pioglitazona mostraron disminución en la expresión del RNAm de la isoforma α (gráfico 4).

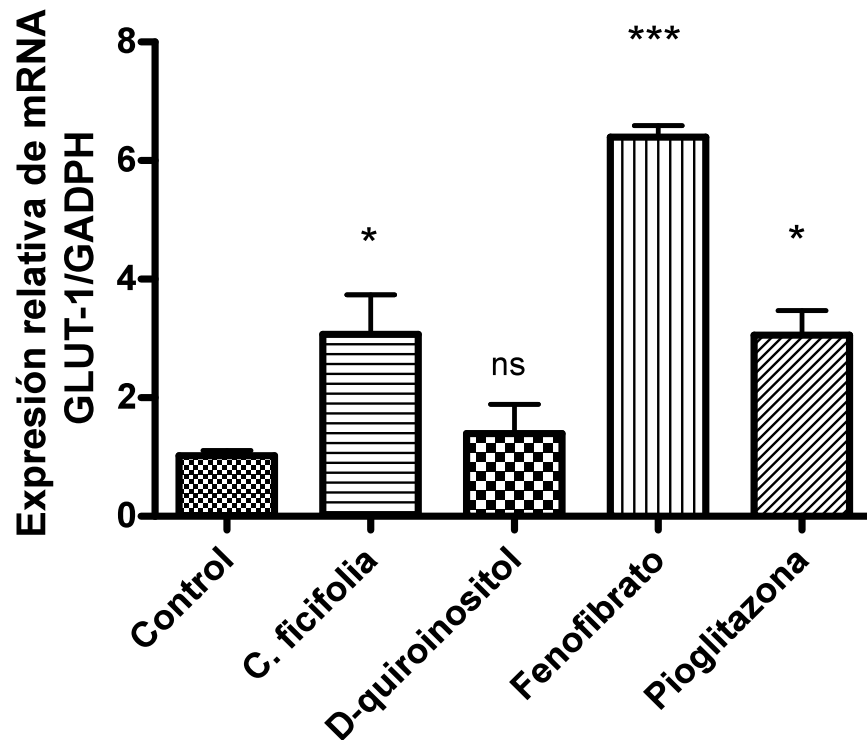


Gráfico 5. Expresión de GLUT-1 en células HepG2 tratadas con *C. ficifolia*, D-QI, fenofibrato y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. $p > 0.05$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.05$.

Los tratamientos con el extracto acuoso de *C. ficifolia*, fenofibrato y pioglitazona, mostraron un aumento significativo en la expresión del RNAm del transportador de glucosa GLUT-1 en comparación con el control. Con D-QI se presentó una tendencia a aumentar la expresión del transportador sin ser significativa (gráfico 5).

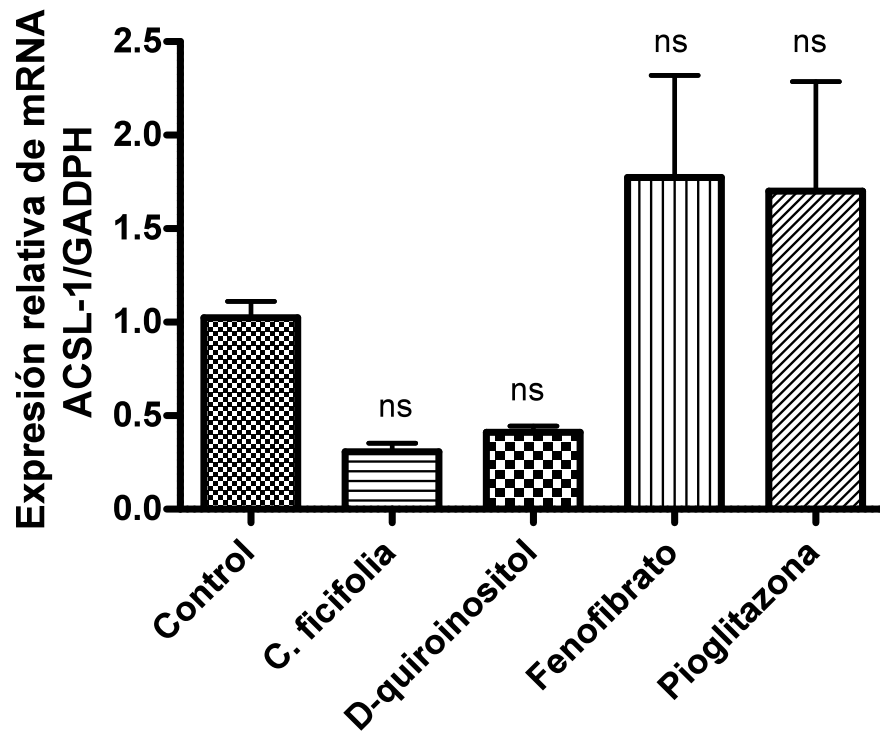


Gráfico 6. Expresión de RNAm de la acetil CoA sintetasa 1 (ACSL-1) en células HepG2 tratadas con *C.ficifolia*, D-QI, fenofbrato y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. ns: $p>0.05$.

Las células tratadas con los controles fenofibrato y pioglitazona, mostraron aumento no significativo en la expresión del RNAm de ACSL-1; por el contrario, las células tratadas con el extracto acuoso y D-QI disminuyeron su expresión del RNAm de manera no significativa (gráfico 6).

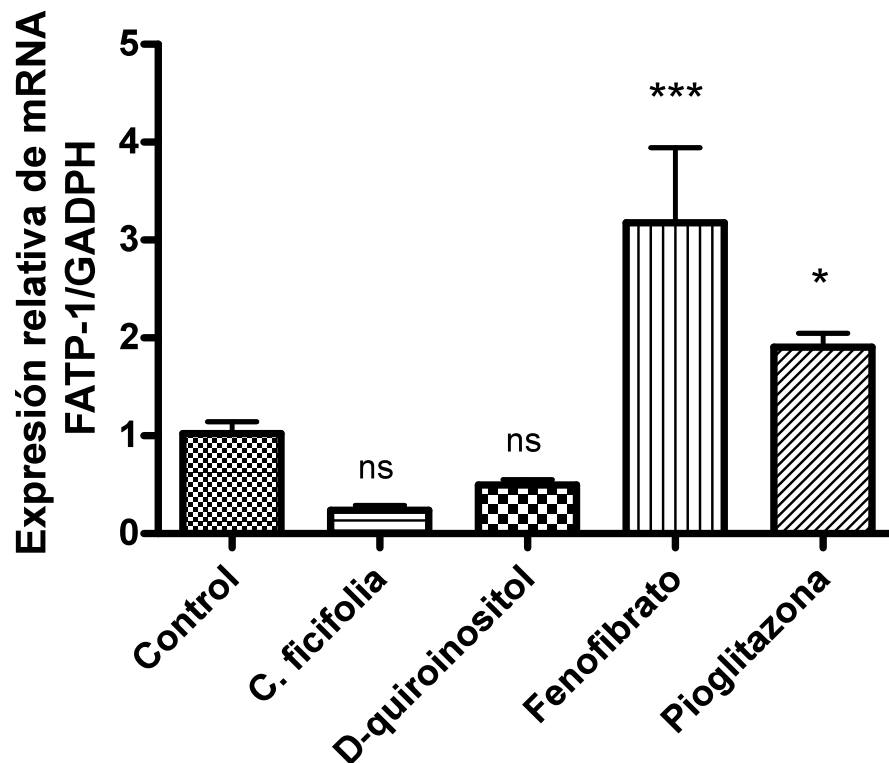


Gráfico 7. Expresión de RNAm de la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (FATP-1) en células HepG2 tratadas con *C. ficifolia*, D-QI, fenofibrato y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6.

ns: $p > 0.05$. * $p < 0.05$ *** $p < 0.05$.

Las células tratadas con fenofibrato y pioglitazona, mostraron un aumento significativo en la expresión del RNAm de FATP-1; por el contrario, las células tratadas con el extracto acuoso y D-QI disminuyeron su expresión, pero no fue estadísticamente significativa (gráfico 7).

VIII.4. CUANTIFICACIÓN DE RNAm DE PPAR- δ , PPAR- γ , ACSL-1, GLUT-4 Y ADIPONECTINA EN ADIPOCITOS 3T3-L1.

Una vez estandarizada la técnica para la realización de la PCR en tiempo real, procedimos a la cuantificación de la expresión de RNAm haciendo triplicados por cada uno de los tratamientos. Los gráficos de expresión relativa obtenidos se muestran a continuación:

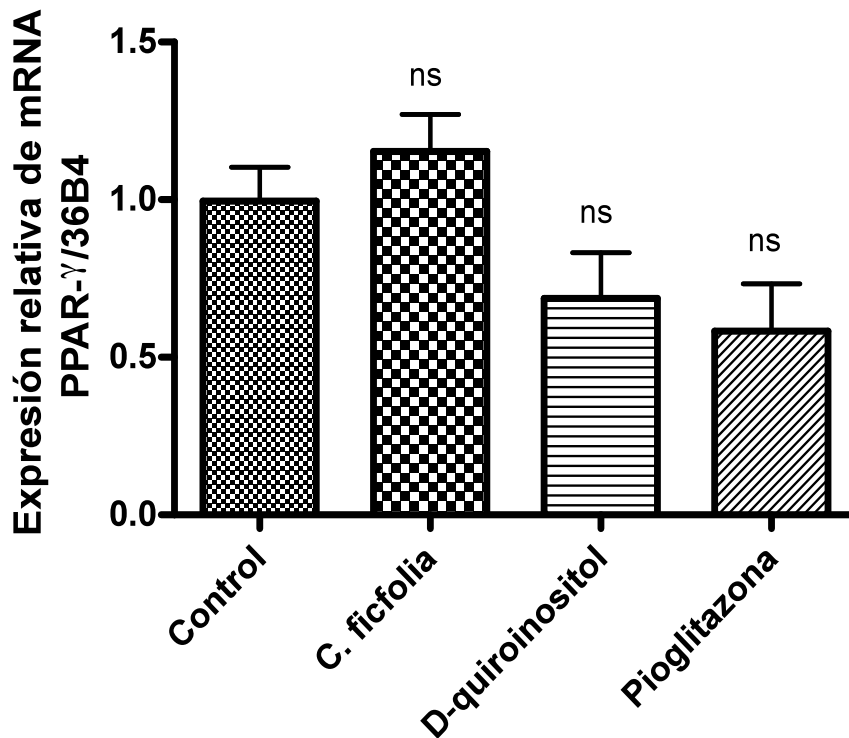


Gráfico 8. Expresión del RNAm de PPAR- γ en adipocitos 3T3-L1 tratados con *C.ficifolia*, D-QI y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. ns: p>0.05.

Como se aprecia en el gráfico 8, en las células tratadas con el extracto se presentó un aumento; aunque no estadísticamente significativo, en la expresión de PPAR- α . Tanto el D-QI como la pioglitazona modificaron la expresión de la isoforma α .

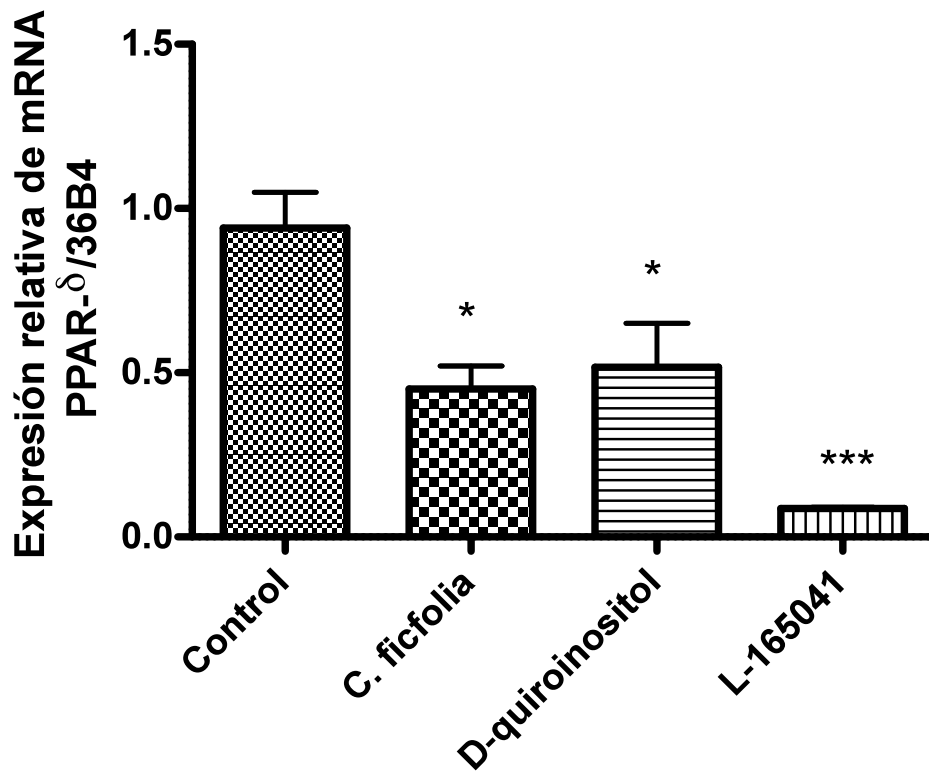


Gráfico 9. Expresión de PPAR- α en adipocitos 3T3-L1, tratados con *C.ficifolia*, D-QI y L-165041. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. *p<0.05. ***p<0.05.

Como se puede apreciar en el gráfico 9, el extracto acuoso disminuyó de manera significativa la expresión de PPAR- α , al igual que el D-QI y el agonista L-165041.

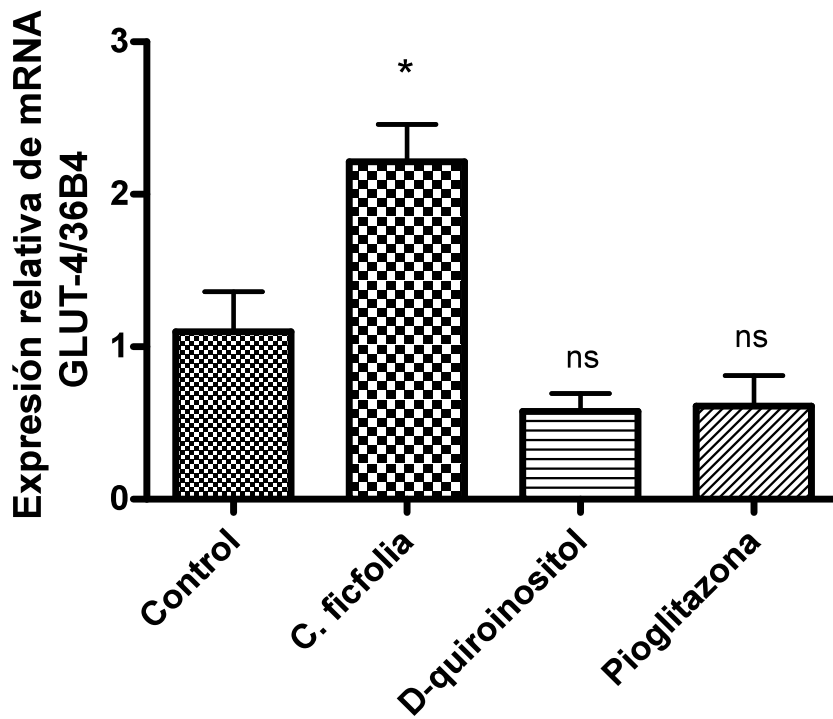


Gráfico 10. Expresión de GLUT-4 en adipocitos 3T3-L1 tratados con *C.ficifolia*, D-QI y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. ns: $p>0.05$. * $p<0.05$.

El extracto acuoso de *C. ficifolia* aumentó de manera significativa la expresión del transportador de glucosa GLUT-4; mientras que el D-QI y la pioglitazona no mostraron ningún efecto sobre la expresión del transportador de glucosa (gráfico 10).

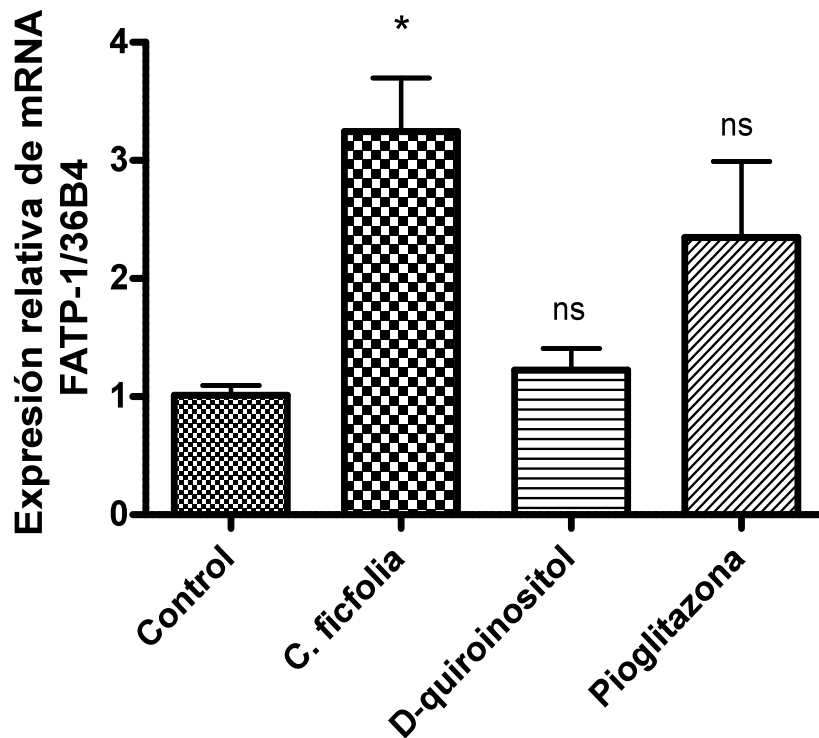


Gráfico 11. Expresión de la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (FATP-1) en adipocitos 3T3-L1 tratados con *C. ficifolia*, D-QI y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. ns: $p > 0.05$.

*: $p < 0.05$.

El extracto acuoso de *C. ficifolia* aumentó de manera significativa la expresión del RNAm de FATP-1; no así en las células tratadas con D-QI y pioglitazona (gráfico 11).

En el caso de la expresión del RNAm de adiponectina (gráfico 12), en ninguno de los grupos tratados se muestra una diferencia significativa en su expresión; aunque se puede observar un ligero aumento en las células tratadas con el extracto acuoso.

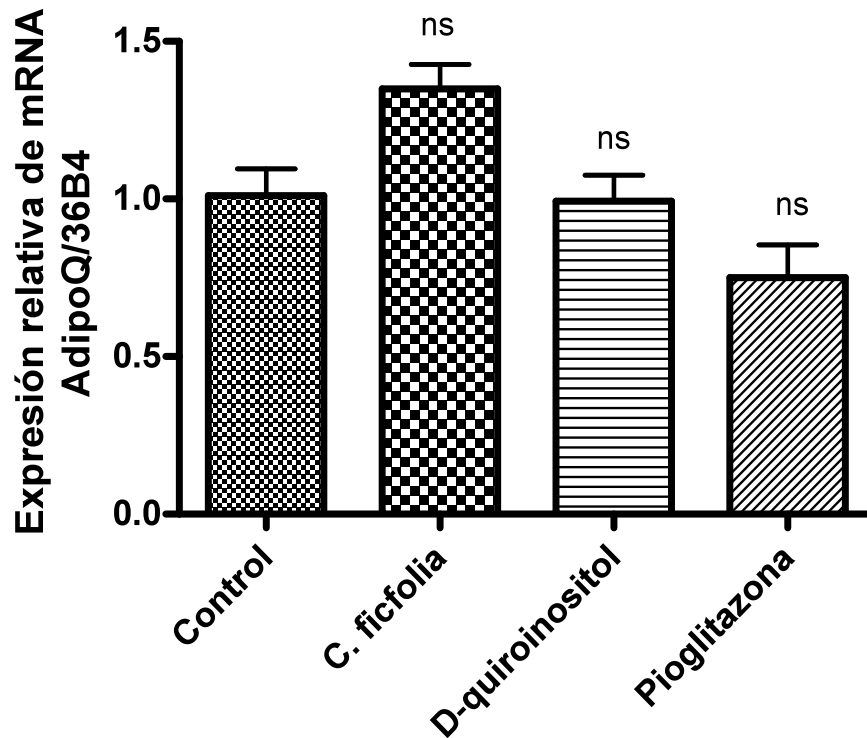


Gráfico 12. Expresión de adiponectina en adipocitos 3T3-L1 tratados con *C. ficifolia*, D-QI y pioglitazona. Los datos corresponden a la media \pm EEM analizados con la prueba ANOVA. n=6. ns: $p>0.05$.

IX. DISCUSIÓN.

El extracto de *C. ficifolia* tiene actividad hipoglucemiante demostrada en modelos animales así como en humanos (Roman *et al.*, 1992, Patiño *et al.*, 2001, Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002, Xia y Wang, 2006, Andrade-Cetto *et al.*, 2005, Xia y Wang,

2010). Es probable que dicha actividad este dada por el D-QI, un glicano que actúa como segundo mensajero en la señalización de la insulina y de quien se tienen antecedentes que demuestran su actividad sobre la RI en pacientes con ovario poliquístico (Nestler *et al.*, 2000, Galazis *et al.*, 2011), Por tal motivo, la concentración del extracto acuoso de *C. ficifolia* a la que fueron tratados los hepatocitos (HepG2) y adipocitos (3T3-L1) se calculó con base en su contenido de D-QI (3.32 mg/g).

En el presente estudio se pudo observar que en las células HepG2 el extracto promovió de manera significativa la expresión de PPAR- α y PPAR- β (gráficos 3 y 4); mientras que en los adipocitos 3T3-L1, la expresión de PPAR- β no se vio aumentada significativamente. La inducción de la adipogénesis en la línea celular 3T3-L1 es precedida por un aumento en la expresión de C/EBP- α y CEBP- β , cuya posterior disminución esta relacionada con un aumento en la expresión de C/EBP- α y PPAR- α . Una vez iniciada la maquinaria transcripcional de diferenciación, los niveles de C/EBP- α y C/EBP- β inducen una disminución en la expresión de PPAR- α y C/EBP- β , de tal manera que se establece un “feedback” positivo que promueve y mantiene el estado diferenciado (Rosen *et al.*, 2002). En el gráfico 8, podemos observar que los niveles de expresión de PPAR- α en los adipocitos tratados con el extracto acuoso, D-QI y pioglitazona no muestran aumento, ni disminución significativa en comparación con el control. Lo anterior podría deberse a que los adipocitos al estar en el octavo día de diferenciación, han iniciado el proceso de adipogénesis, manteniéndose los constantes los niveles del RNAm de PPAR- α ; quien promueve la expresión de genes implicados en la adipogénesis como es el caso de GLUT-4.

En el gráfico 5, se muestra que las células tratadas con el extracto acuoso y los agonistas, tanto para PPAR- α como para PPAR- γ , mostraron aumento significativo en la expresión del RNAm del GLUT-1, lo que posiblemente está relacionado con el efecto hipoglucémico del extracto a nivel sistémico, al promover la captación de glucosa en el hepatocito; es probable que haga lo mismo en los diferentes tejidos que lo expresan, generando disminución de la glucemia.

El GLUT-1 es un transportador de glucosa que se expresa indistintamente en muchos órganos, principalmente los que llevan a cabo una elevada captación de glucosa como son el cerebro, hígado, músculo, páncreas y tejido adiposo. En un trabajo realizado por Ge y colaboradores en el 2007, se pudo observar que la sobreexpresión de GLUT-1 en el músculo esquelético de ratones, aumenta 3 a 4 veces la captación de glucosa, en comparación con la captación basal, lo que tuvo como resultado una disminución de la glucosa a nivel plasmático. Con lo anterior se pudo demostrar que la expresión tanto del gen como de la proteína funcional GLUT-1 puede afectar el control sistémico de la glucemia (Ge *et al.*, 2007).

En el caso del fenofibrato y la pioglitazona, el aumento en la expresión del transportador puede estar mediado por la activación inducida por ambos agonistas. Lo anterior se debe posiblemente a que el extracto promueve la expresión del RNAm de las isoformas PPAR- α y PPAR- γ , y probablemente estimule su activación induciendo su interacción con los PPREs localizados en la región promotora del gen que codifica para el transportador de glucosa, similar al mecanismo reportado por Daynes y Dallas en el 2002 (Daynes y Dallas., 2002). Este mecanismo de activación

en los PPARs está dado por pequeños cambios estructurales en el receptor, que le permiten disociarse de complejos corepresores y asociarse con coactivadores transcripcionales, además de proporcionarle la capacidad de unirse al DNA y de adquirir la habilidad de transactivación (Daynes y Dallas., 2002).

Es posible que el aumento en la expresión de GLUT-1 por efecto del extracto este relacionado con el estímulo de la vía HIF-1 α /ARNT y no mediante la activación de PPARs. Existen reportes de que el promotor de GLUT-1 en hepatocitos HepG2 tiene regiones de respuesta al complejo de transcripción HIF-1 α /ARNT (Macheda et al; 2004); entonces, quizá esta línea celular no sea la más adecuada para el estudio de la activación de PPAR- α dado su origen carcinogénico y a las condiciones de hipoxia que presenta. Para asegurar si efectivamente el extracto acuoso de *C. ficifolia* promueve la expresión de GLUT-1 en el hígado, es recomendable la utilización de cultivo primario de hepatocitos como modelo de estudio, con lo cuál se disminuiría la variable de hipoxia presente en líneas de origen carcinógeno.

En el gráfico 3 se muestra que el extracto acuoso mantiene una tendencia de aumento sobre la expresión de PPAR- α , pero no aumenta la expresión de ACSL-1 (gráfico 6). Lo anterior puede deberse a que el extracto regula a nivel transcripcional la expresión de PPAR- α , pero posiblemente no promueve su paso al núcleo y su unión a los PPREs, por lo que no es capaz de potenciar la expresión de la enzima ACSL-1. Sin embargo, tanto el fenofibrato como la pioglitazona, cuyo mecanismo de acción está dado por la activación de PPAR- α y PPAR- γ , respectivamente, sí promueven un ligero aumento en la expresión del RNAm de ACSL-1, aunque no es

significativa (gráfico 3). Es probable que ha nivel de proteína los cambios puedan apreciarse con facilidad. Se ha reportado que la pioglitazona, además de actuar como un ligando para PPAR- α , también actúa como agonista débil de PPAR- α (Wang *et al.*, 2007), por lo que estimula la expresión de genes regulados por la isoforma α .

En relación con la participación de PPAR- α en el metabolismo de los ácidos grasos, se conoce que este factor de transcripción puede modular la expresión de las acetil-CoA sintetasas de cadena larga (ACSL), las cuales catalizan el primer paso en el metabolismo de lípidos ya que convierten los AG de cadena larga en tioésteres de acil CoA. Se han descrito 5 isoformas que han sido clonadas y caracterizadas en mamíferos (Li *et al.*, 2006; Soupene y Kuypers, 2008). Los grupos acetil-CoA participan en vías anabólicas y catabólicas por lo que pueden participar tanto en la síntesis de TG como en el proceso de oxidación. La isoforma 1 de las ACSL (ACSL-1), que en caso de humanos está compuesta por 698 residuos de aminoácidos, se encuentra altamente expresada en hígado, tejido adiposo y corazón. La sobreexpresión del RNAm de *Acs/1* tanto en tejido adiposo como en hígado se ve potenciada mediante la activación del PPAR- α , lo que abre la posibilidad de que la ACSL-1 esté participando en el proceso de α -oxidación de AG. En un modelo *in vivo* con ratones knock-out de ACSL-1 en hígado, se observó una disminución del 50% de la actividad total de las ACSL y se redujo entre 25% a 35% el contenido de acetil-CoA de cadena larga (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Tanto las vías catabólicas como las de síntesis se ven alteradas cuando existen procesos patológicos como

esteatosis hepática, hiperlipidemia y resistencia a la insulina (Li *et al.*, 2006). Estudios realizados en hepatocitos humanos tratados con Wy14643, un agonista de PPAR- α , reveló una sobreexpresión de genes que participan en la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial y en cetogénesis, como la 3-hidroxi- 3-metilglutaril-CoA sintetasa 2 (HMGCS2), carnitina palmitoil tranferasa A (CPT1A), carnitina palmitoil tranferasa 2 (CPT2), en la oxidación de ácidos grasos a nivel de peroxisomas, como la enoil CoA sintetasa 1 peroxisomal (ECH1) y citocromo P450, familia 4, subfamilia A, polipeptido 11 (CYP4A11), así como sobreexpresión de los genes que participan en la unión y activación de ácidos grasos, como la proteína unidora de ácidos grasos 1 en hígado (FABP1), y las isoformas 1 y 3 de la acil-CoA sintetasa de cadena larga (ACSL-1, ACSL-3). Los anteriores estudios demuestran la importancia de PPAR- α en la regulación del metabolismo de lípidos, tanto en humanos como en modelos *in vivo* (Rakhshandehroo *et al.*, 2009).

La expresión de GLUT-1 en las células HepG2 tratadas con el extracto acuoso contrasta con la expresión de los RNAm de ACSL-1 y FATP-1 (gráficos 6 y 7), cuyos niveles de expresión se ven reprimidos. Entonces, es posible que el extracto estimule la expresión a nivel transcripcional de PPAR- α y PPAR- β ; pero no promueve su internalización nuclear y su interacción con los PPERs de las regiones promotoras de estos genes; mientras que en el caso de GLUT-1, el incremento podría deberse al estímulo de la vía HIF-1 α /ARNT activada por las condiciones de hipoxia de la línea celular. Para determinar si efectivamente existe activación de los PPARs por acción del extracto, es preciso realizar técnicas de biología molecular; como el ensayo de

retardo electroforético (EMSA) e inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP) y hacer uso del cultivo primario de hepatocitos como modelo de estudio para evitar las condiciones de hipoxia presente en la línea HepG2.

En el gráfico 11 podemos observar que el extracto promueve de manera significativa la expresión del RNAm del FATP-1, lo que puede estar relacionado con el aumento en la expresión, aunque no significativa, del RNAm de PPAR- α en la línea celular 3T3-L1. Lo anterior podría sugerir que además de aumentar la expresión del PPAR- α en los adipocitos, el extracto acuoso del fruto de *C. ficifolia* aparentemente también promovería su traslocación al núcleo así como su interacción con los PPREs localizados en la región promotora del gen que codifica para FATP-1, ya que éste último se sobreexpresa en presencia del extracto.

El aumento en la expresión del RNAm, tanto de FATP-1 como del transportador de glucosa GLUT-4 (gráficos 10 y 11) en los adipocitos 3T3-L1 tratados con el extracto acuoso de *C. ficifolia*, posiblemente sean parte del efecto hipoglucémico del fruto, ya que de ser proteínas funcionales, promoverían la captación de glucosa y AG, promoviendo su almacenamiento en forma de TG, disminuyendo así la concentración de glucosa y lípidos circulantes, como se ha demostrado en modelos animales (Nguyen *et al.*, 2008; Sandoval *et al.*, 2008).

La activación del PPAR- α , induce la sobreexpresión de enzimas lipogénicas como la acetil-CoA carboxilasa, la ácido graso sintasa, la glicerol-fosfato acetil transferasa, y los transportadores como FATP y GLUT-4, tanto en el hígado como el tejido adiposo

(Nguyen *et al.*, 2008). El proceso de transporte de los ácidos grasos a través de la membrana plasmática, denominado acilación vectorial, ocurre por algunos mecanismos que involucran tanto proteínas transportadoras como algunas enzimas, como son las FATPs y las ACSLs. En la acilación vectorial, los ácidos grasos exógenos son transportados a través de la membrana plasmática en acción conjunta con la activación de tioésteres de CoA, producidos por la acción de las ACSLs. Se ha demostrado en diversos estudios hechos por Sandoval y colaboradores en el 2008, que tanto la FATP como ACSL funcionan de manera conjunta sobre la membrana plasmática, orquestando el mecanismo por el cual se lleva a cabo la acilación vectorial de ácidos grasos exógenos (Martin *et al.*, 2000; Black y DiRusso, 2007; Nguyen *et al.*, 2008; Sandoval *et al.*, 2008). Sandoval y col. pudieron observar que la FATP-1 y la ACSL-1 son las principales isoformas expresadas en la línea de adipocitos 3T3-L1, consistente con su función de transporte y activación de ácidos grasos destinados a su almacenamiento en forma de TG.

El D-QI es un glicano que actúa como segundo mensajero en la vía de señalización clásica de la insulina. Se ha demostrado que su administración oral mejora la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina presente en pacientes con ovario poliquístico y DT2 (Nestler *et al.*, 2000, Galazis *et al.*, 2011). Debido al antecedente de acción hipoglucemiante que posee el D-QI, su concentración en el extracto acuoso (3.32 mg/g de extracto) se utilizó como referencia para calcular la concentración a la cuál se aplicaron los tratamientos con el extracto de *C. ficifolia*.

Puesto que además del D-QI también se logró identificar ácido gálico a una concentración de 7.47 mg/g de extracto, existe la posibilidad de que sea este compuesto quien ejerza el aumento en los niveles de expresión de los PPARs y de los transportadores GLUT-1, GLUT-4 y FATP-1, por lo que resulta importante su utilización como tratamiento en las líneas celulares en investigaciones posteriores.

Como lo demuestran los resultados de expresión, el D-QI sintético no aumentó de manera significativa la expresión de ninguno de los genes de estudio. Considerando que los ligandos naturales de los PPARs son de naturaleza lipofílica como por ejemplo: ácidos grasos saturados e insaturados y de cadena larga; eicosanoides y derivados del metabolismo del ácido araquidónico como los leucotrienos, ácidos hidroxieicosatetranoicos y prostaglandinas (Daynes y Jones., 2000); es poco probable que el D-QI por su naturaleza polar pueda tener efecto sobre la expresión de genes blanco de los PPARs. Se tiene el antecedente de que algunos terpenoides; particularmente isoprenoles como el farnesol y el geranilgeraniol tienen actividad como agonistas duales de PPAR- α y PPAR- γ en células HepG2 y 3T3-L1, modificando patrones de expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos, lo que abre la posibilidad de que compuestos como carotenoides, terpenoides e isoprenoides puedan actuar como posibles activadores de PPARs (Takahashi *et al.*, 2002). En este sentido, las cucurbitacinas son compuestos que constituyen un grupo de triterpenos que se caracterizan por la presencia de un esqueleto cucurbitano (19-(10 β 9 β)-abeo-10 β -lanostano-5-ene) y que se describieron en un principio en especies de la familia Cucurbitaceae; aunque

actualmente se han identificado en otras plantas. Las semillas y los frutos de algunas cucúrbitas actúan como purgantes y poseen efectos eméticos y antihelmínticos debido a su contenido de cucurbitacinas (Chen *et al.*, 2005, Dhiman *et al.*, 2012).

Por lo anterior se hace necesaria una caracterización más detallada de los compuestos que integran el extracto acuoso de *C. ficifolia* con la finalidad de determinar sus posibles efectos sobre la activación de los PPARs, tomando como referencia la estructura característica de los terpenos así como su naturaleza lipofílica, con la finalidad de realizar futuras investigaciones.

Debido a que los extractos son matrices complejas constituidas por compuestos de diferente naturaleza, el o los mecanismos de acción involucrados pueden incluir sinergismos que no es posible describirlos en su totalidad con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, queda claro que el extracto de *C. ficifolia* contiene agonistas de PPARs que modifican el metabolismo de glucosa y de lípidos. Estas alteraciones pueden impactar de manera directa o indirecta sobre otros tipos celulares, afectando o restableciendo procesos que se encuentran alterados en estados patológicos, como es el caso de la respuesta inflamatoria crónica leve característica de obesidad, diabetes mellitus y otras enfermedades metabólicas.

X. CONCLUSIONES

1. La prueba de funcionalidad celular indicó que el tratamiento con el extracto acuoso de *C. ficifolia* conteniendo 0.078 mM D-QI no provoca daño en las líneas celulares HepG2 y 3T3-L1.
2. El D-QI no promueve un aumento significativo en la expresión relativa de los RNAm de los genes de estudio.
3. El extracto acuoso aumenta la expresión de los RNAs mensajeros de PPAR- α y PPAR- β , así como del transportador de glucosa GLUT-1 en la línea de hepatocitos HepG2.
4. El extracto acuoso promueve la expresión de los RNAs mensajeros que codifican para el transportador de glucosa GLUT-4 y la proteína transportadora de ácidos grasos FATP-1 en la línea de adipocitos 3T3-L1.

XI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la activación de los PPARs en presencia del extracto acuoso de *C. ficifolia*, mediante la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Usando las técnicas de

Western Blot y de inmunolocalización podremos determinar si las enzimas y transportadores involucrados en el metabolismo de lípidos y glucosa; cuya expresión a nivel de RNAm se encuentra elevada, están en su forma activa.

2. Es importante evaluar el efecto que tiene la activación de los PPARs (modulada por *C. ficifolia*) en otros tipos celulares, en particular en macrófagos, ya que su infiltración al tejido adiposo obeso promueve la activación del sistema inmune innato a través de los TLRs, generando con ello un estado de inflamación crónica de bajo grado; mismo que puede desencadenar resistencia a la insulina y una subsecuente DT2.

XII. REFERENCIAS

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. 2007. International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. *Diabetes Medicine*. (24): 451-463.

Alarcon FJ, Hernandez EH, Campos AE, Xolalpa SH, Rivas JF, Vazquez LI, Roman R. 2002. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *Journal Ethnopharmacology*. (82): 185-189.

Alarcon FJ, Roman R, Jimenez M, Reyes R, Gonzalez B, Flores JL. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Journal Ethnopharmacology*. (55): 171-177.

Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal Ethnopharmacology*. (99): 325-348.

Bailey CJ. 2000. Potential new treatments for type 2 diabetes. *Trends in Pharmacological Sciences*. (21): 259-265.

Balakumar P, Rose M, Ganti SS, Krishan P, Singh M. 2007. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box?. *Pharmacological Research*. (56): 91–98.

Berger J y Moller DE. 2002. The mechanisms of action PPARs. *Annual Review of Medicine*. (53): 409–35.

Black PN, DiRusso CC. 2007. Vectorial acylation: linking fatty acid transport and activation to metabolic trafficking. *Novartis Foundation Symposium*. 286:127-38; discussion 138-41, 162-3, 196-203.

Bryant NJ, Gorves B, James DE. 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. (3): 267-277.

Campbell, I. W. 2005. Nateglinide-current and future role in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Pract*. (59): 1218–1228.

Chen JC, Chiu MH, Nie RL, Cordell GA, Qiu SX. 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Natural Products Reports*. 22(3):386-99.

Cheng AY, Fantus I.G. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. (172): 213-26.

Choi SS, Cha BY, Iida K, Lee YS, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT. 2011. Artepillin C, as a PPAR α ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Biochemical Pharmacology*. (81): 925-933.

Committee Report. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* (20): 1183-1198.

Daynes RA, Jones DC. 2002. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. (10):748-59.

Dhiman K, Gupta A, Sharma D.K, Gill N.S, Goyal A. 2012. A Review on the Medicinally Important Plants of the Family Cucurbitaceae. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 4: 16-26.

Dunn FL, Higgins LS, Fredrickson J, DePaoli AM. 2010. Selective modulation of PPAR α activity can lower plasma glucose without typical thiazolidinedione side-effects in patients with Type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*. (25): 151-158.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, y Paschke R. 2001. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. (507): 142-146.

Fiévet C, Fruchart J-C, Staels B. 2006. PPAR α and PPAR γ dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Pharmacology*. (6): 606–614.

Fredenrich A, Grimaldi PA. 2005. PPAR delta: an uncompletely know nuclear receptor. *Diabetes and metabolism*. (31): 23-27.

Galazis N, Galazi M, Atiomo W. 2011. D-Chiro-inositol and its significance in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Gynecological Endocrinology*. 27(4):256-62.

Ge TF, Law PY, Wong HY, Ho YY. 2007. Gatifloxacin affects GLUT1 gene expression and disturbs glucose homeostasis in vitro. *European Journal of Pharmacology* (573): 70–74.

Grisouard J, Timper K, Radimerski TM, Frey DM, Peterli R, Kola B, Korbonits M, Herrmann P, Krähenbü S, Zulewski UK, Keller U, Müller B, Christ-Crain M. 2010. Mechanisms of metformin action on glucose transport and metabolism in human adipocytes. *Biochemical Pharmacology*. (80): 1736–1745.

Gross B, Staels B. 2007. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. (21): 687–710.

Haluzík MM y Haluzík M. 2006. PPAR- α and Insulin Sensitivity. *Physiological Research*. (55): 115-122.

Hu FB, van Dam RM, Liu S. 2001. Diet and risk of Type 2 diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*. (44): 805-817.

Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ. 2012. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*. 33(1):26-34.

Kendall D, Rubin C, Mohideen P, Ledezine J-M, Belder R, Gross J, Norwood P, O'Mahony M, Sall K, Sloan G, Roberts A, Fiedorek F, De Fronzo R. 2006. Improvement of Glycemic Control, Triglycerides, and HDL Cholesterol Levels With Muraglitazar, a Dual (α/β) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activator, in Patients With Type 2 Diabetes Inadequately Controlled With Metformin Monotherapy. *Diabetes Care*. (29): 1016–1023.

Kleiner S, Nguyen-Tranz V, Baré O, Huang X, Spiegelman B, Wu Z. 2009. PPAR α agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. (28): 18624-18633.

Li LO, Mashek DG, An J, Doughman SD, Newgard CB, Coleman RA. 2006. Overexpression of Rat Long Chain Acyl-CoA Synthetase 1 Alters Fatty Acid Metabolism in Rat Primary Hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. (281): 37246 - 37255.

Li LO, Ellis JM, Paich HA, Wang S, Gong N, Altshuler G, Thresher RJ, Koves TR, Watkins SM, Muoio DM, Cline GW, Shulman GI, Coleman RA. 2009. Liver-specific Loss of Long Chain Acyl-CoA Synthetase-1 Decreases Triacylglycerol Synthesis and α -Oxidation and Alters Phospholipid Fatty Acid Composition. *The Journal of Biological Chemistry*. (284): 27816 – 27826.

Luquet S, Gaudel C, Holst D, López-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi P. 2004. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) in the control of fatty acid catabolism. A new target for the treatment of metabolic syndrome. *Biochimie*. (86): 833-837.

Luquet S, Gaudel C, Holst D, López-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi P. 2005. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2): 313-317.

Martin G, Poirier H, Hennuyer N, Crombie D, Fruchart JC, Heyman RA, Besnard P, Auwerx J. 2000. Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective rexinoids suggest that the peroxisome proliferator-activated receptor retinoid X receptor heterodimer is their molecular target. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(17):12612-8.

Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Häring HU. 2000. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine reviews*. 21(6):585-618.

Mateos N, Zacarías R. 2002. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Revista del Hospital General "Dr. Manuel Gea González*. (5): 33-41.

Nestler JE, Jakubowicz DJ, Luorno MJ. 2000. Role of inositolphosphoglycan mediators of insulin action in the polycystic ovary syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 5:1295-1298.

Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. 2008. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and animal nutrition*. 92(3):272-283.

Patiño JL, Jiménez E, Juárez MA, Díaz JC. 2001. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *Journal Ethnopharmacology*. (77): 99–101.

Programa Nacional de Salud 2007-2012. 2007. Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud. Secretaría de Salud. México DF. 26-35.

Rakhshandehroo M, Hooiveld G, Müller M, Kersten S. 2009. Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPAR alpha between mouse and human. *Public Library of Science: Plos one*. (8): 1-13.

Román R, Flores JL, Partida G, Lara A, Alarcón F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivo de Investigación Médica (México)*. (22): 87-93.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2002. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes y Development*. 16(1):22-6.

Ruan X, Zheng F, Guan Y. 2008. PPARs and the kidney in metabolic syndrome. *American Journal Physiology. Renal Physiology*. (294): 1032-1047.

Sandoval A, Fraisl P, Arias-Barrau E, Dirusso CC, Singer D, Sealls W, Black PN. 2008. Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 477 (2):363-71.

Seimandi M, Lemaire G, Pillon A, Perrin A, Carlavan I, Voegel J, Vignon F, Nicolas J-C, Balaguer P. 2005. Differential responses of PPAR α , PPAR β , and PPAR γ reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Analytical Biochemistry*. (344): 8–15.

Soupene E, Kuypers FA. 2008. Mammalian Long-Chain Acyl-CoA Synthetases. *Experimental Biology and Medicine*.(233): 507-521.

Suggi S, Olson P, Sears DD, Saberi M, Atkins AR, Barish GD, Hong SH, Castro GL, Yin YQ, Nelson MC, Hsiao G, Greaves DR, Downes M, Yu RT, Olefsky JM, Evans RM. 2009. PPAR γ activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (106): 22504-22509.

Tahrani AA, Piya MK, Kennedy A, Bammet AH. 2010. Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacology and Therapeutics*. (125): 328-361.

Takahashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Matsui N, Kimura K, Saito M, Hosokawa M, Miyashita K, Fushiki T. 2002. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR α and PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *Federation of European Biochemical Societies*. (514): 315-322.

Wang Z, Liu Q, Li P, Zou C, Shen Z. 2008. Effect of GCP-02, a PPAR α / γ dual activator, on glucose and lipid metabolism in insulin-resistant mice. *European Journal of Pharmacology*. (580): 277–283.

Universidad Nacional Autónoma de México. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> Consultado en: Febrero 2011.

Xia T y Wang Q. 2006. Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Fitoterapia*. (77): 530-533.