

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M. en B.E. Jessica García González

**Caracterización química de *Cucurbita ficifolia* Bouché y su efecto
hipoglucémico mediado por almacenamiento del glucógeno hepático**

Codirectores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dr. Mario García Lorenzana

Asesor:

Dr. Julio César Almanza Pérez

Ciudad de México, Marzo 2017

COMITÉ TUTORAL

Codirector

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular "C"
Lab. de Farmacología
Depto. Ciencias de la Salud
D. C. B. S. UAM-Iztapalapa
fjaa@xanum.uam.mx

Codirector

Dr. Mario García Lorenzana

Profesor Titular "C"
Lab. de Neurobiología Tisular
Depto. Biol. de la Reproducción
D. C. B. S. UAM-Iztapalapa
mglo@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Julio César Almanza Pérez

Profesor Titular "C"
Lab. de Farmacología
Depto. Ciencias de la Salud
D. C. B. S. UAM-Iztapalapa
jcap@xanum.uam.mx

El programa de doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 0904-0) pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (C) y cuenta con el apoyo del mismo consejo mediante el programa PNP-CONACyT-SEP a través del convenio número 309-0 y clave del programa C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, bajo la codirección del Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar y asesoría del Dr. Julio César Almanza Pérez, así como en el laboratorio de Neurobiología Tisular, del Departamento de Biología de la Reproducción, bajo la codirección del Dr. Mario García Lorenzana, ambos laboratorios de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Así mismo, se realizaron diversas actividades en el Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social, con asesoría del Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

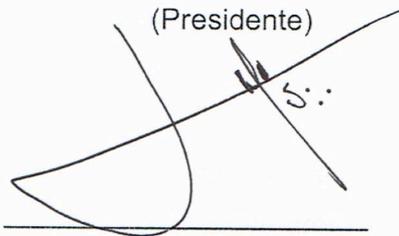
El trabajo de investigación se realizó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, con número de becario 39990 y CVU 330726) y Fondo Sectorial de Investigación SEP-CONACYT CB-2006-1-60181 y para la realización de la tesis con apoyo del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT con número de folio 16BTID0050).

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes,

aprobaron la tesis titulada: **Caracterización química de *Cucurbita ficifolia* Bouché y su efecto hipoglucémico mediado por almacenamiento del glucógeno hepático** con fecha del 24 de marzo de 2017.

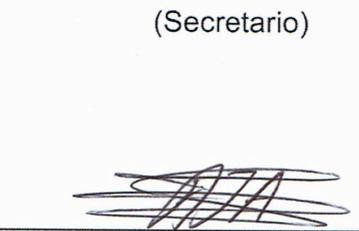
Dr. José Luis Flores Sáenz

Profesor titular C
Dpto. Ciencias de la Salud D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
jifs@xanum.uam.mx

(Presidente)

S.:

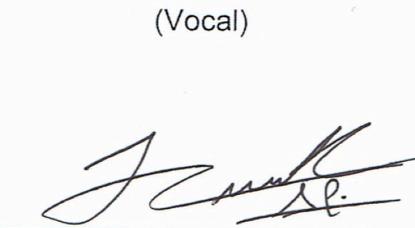
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Investigador titular B
Laboratorio de Fitoquímica
Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS)
azamilpa_2000@yahoo.com.mx

(Secretario)


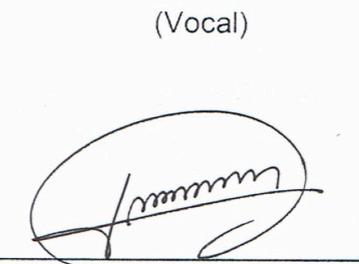
Dr. Julio César Almanza Pérez

Profesor titular C
Dpto. Ciencias de la Salud D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
jcap@xanum.uam.mx

(Vocal)


Dra. Margarita Díaz Flores

Investigador asociado C
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS
mardiaz2001@yahoo.com

(Vocal)


DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A la persona que camina a mi lado, mi pilar, mi alegría, mi fortaleza, mi amor, mi inspiración, **Rafael**. Gracias por el brillo en mi alma.

A mi **madre** por instruirme en la disciplina del saber, que hoy define mi vida. Gracias, por que sin ti madre no habría podido llegar a las aulas y mucho menos sembrar un pequeño legado a los que vienen detrás de mi.

A mi **padre** por demostrarme que se puede, y por no reprocharme nada a pesar de lo duro que ha sido su andar, gracias por darme un nuevo futuro.

A mi **abuela**, mi gran apoyo, gracias por tu paciencia y tu amor mami.

Mis **hermanas**, por compartir la belleza de su personalidad, todas diferentes, gracias por apoyarme y alentarme en cada paso de mi vida.

Agradezco a mis guías, mis maestros en todos sentidos, mis directores y mi asesor, **Dr. Francisco, Dr. Mario y Dr. Julio**, por su apoyo en este proyecto y en la publicación del artículo, sin ustedes esto no hubiera podido ser posible, gracias a que son grandes investigadores, personas como yo continuamos creciendo profesionalmente.

Agradezco a las personas que me acompañaron en esta etapa, las que me ayudaron en cada resultado que en esta tesis se presenta, los que compartieron un momento de su vida para compartir su conocimiento, su alegría, su compañía, su momentos difíciles, **Iván, Gaby, Julio, Gerardo, Angeles, Mayra, Wen, Giaco, Andrés, Tania y Ana**.

Agradezco al **Dr. Alejandro Zamilpa** el apoyo, observaciones, por dedicarme tiempo y espacio en su laboratorio aun sin ser su alumna.

Agradezco a la **Dra. Margarita, Dr. José Luis** y al **Dr. Rubén** por sus observaciones, aportaciones y su tiempo en la conclusión de este proyecto.

RESUMEN

Cucurbita ficifolia Bouché (*C. ficifolia*) es una planta medicinal con uso en el tratamiento de la diabetes mellitus (DM), enfermedad con una importancia epidemiológica importante que radica en sus altos índices de prevalencia y mortalidad.

Se tienen evidencias experimentales y clínicas acerca de su acción hipoglucemiante. Sin embargo, aún siguen faltando estudios fitoquímicos y farmacológicos para elucidar, por un lado, sus principales componentes activos, y por otro, sus mecanismos de acción hipoglucemiante, en particular el efecto que tiene sobre el hígado, uno de los órganos involucrados en el metabolismo de carbohidratos.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar químicamente un extracto acuoso de *C. ficifolia* Bouché y evaluar marcadores que regulan la síntesis de glucógeno hepático, así como la morfología histológica del hígado y páncreas.

Se fraccionó el extracto acuoso de *C. ficifolia* mediante cromatografía en columna abierta, en capa fina y por HPLC para purificar sus principales metabolitos secundarios y posteriormente se caracterizaron químicamente por RMN y CG-MS. El estudio farmacológico consistió en un estudio agudo en ratones de la cepa CD-1 sanos y diabéticos, una vez que se determinó que el extracto tenía actividad hipoglucemiante se realizó un estudio subcrónico usando ratones de la cepa CD-1 tanto sanos como diabéticos, inducidos con aloxana, a los cuales se les administró por 30 días el extracto acuoso y activo de *C. ficifolia*. El contenido de glucógeno hepático se cuantificó por un método espectrométrico, se realizó un análisis histológico del hígado usando una

tinción de PAS y de H-E para hígado y páncreas; GOT y GPT se cuantificaron por un método espectrofotométrico; las enzimas glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa y el transportador de glucosa GLUT-2 se cuantificaron por Western blot; la expresión del RNAm de Glut-2 y el receptor de glucagón se determinaron por RT-PCR en tiempo real, mientras que los niveles de insulina sérica se cuantificaron por el método de ELISA.

Los resultados confirman que la administración de *C. ficifolia* a ratones sanos y diabéticos reduce los niveles de glucemia y corrige algunos parámetros característicos de DT2, como los niveles de transaminasas y el perfil inflamatorio observado en el análisis histológico en hígado y páncreas. *C. ficifolia* no modificó la estructura general del hígado ni del páncreas. *C. ficifolia* aumentó el contenido de glucógeno hepático, sugiriendo que el mecanismo de acción hipoglucemiante de la planta podría estar mediado en parte por acumulación de glucosa en forma de glucógeno.

En este estudio se logró aislar e identificar siete compuestos mayoritarios presentes en el extracto acuoso activo de *C. ficifolia*, de los cuales: dos son fitosteroles, tal es el caso de, estigmasten-7,22-dien-3-ol y estigmasten-7-en-3-ol, así como ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *o*-hidroxifenilacético, ácido *p*-hidroxifenilacético y salicina, los cuales se han reportado con actividad farmacológica y con efectos hipoglucémicos, tal es el caso del ácido *p*-hidroxibenzoico. Sin embargo, aún se debe determinar cuál es el principal compuesto activo del extracto, o si están actuando sinérgicamente.

El análisis histológico de hígado mostró una mejora en la estructura general de este órgano del grupo experimental tratado con *C. ficifolia*, así como

un aumento en la acumulación de glucógeno. También se observó aumento de glucógeno sintasa y disminución de glucógeno fosforilasa, enzimas implicadas en la síntesis y degradación de glucógeno. *C. ficifolia* representa una alternativa terapéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus, y su efecto hipoglucémico se debe parcialmente a la acumulación de glucógeno hepático, ya que se ha demostrado que es capaz de generar otros efectos moleculares asociados a la hipoglucemia. Además, *C. ficifolia* genera efecto protector, tanto en hígado como en páncreas, lo que potencialmente podría ayudar a un mejor control de la diabetes, previniendo el desarrollo de complicaciones vasculares y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

ABSTRACT

Cucurbita ficifolia Bouche (*C. ficifolia*) is a medicinal plant used in the treatment of diabetes mellitus (DM), a disease with an important epidemiological importance that lies in its high prevalence and mortality rates.

There are experimental and clinical evidences about its hypoglycemic action. However, phytochemical and pharmacological studies are still lacking to elucidate, on the one hand, its main active components, and on the other, its hypoglycemic mechanisms of action, in particular the effect on the liver, one of the organs involved in carbohydrates' metabolism.

The objective of the present work was characterizing chemically an aqueous extract of *C. ficifolia* Bouche and to evaluate markers that regulate hepatic glycogen synthesis, as well as the histological morphology in liver and pancreas.

The aqueous extract of *C. ficifolia* was fractionated by open-column chromatography, thin layer chromatography and by HPLC to purify its main secondary metabolites and was subsequently chemically characterized by NMR and GC-MS. The pharmacological study consisted of an acute study in healthy and diabetic CD-1 strain mice, once the extract was determined to have hypoglycemic activity, a subchronic study was performed using CD-1 mice both healthy and diabetic induced with alloxan, which were given the aqueous and active extract of *C. ficifolia* for 30 days. The hepatic glycogen content was quantified by a spectrometric method; a histological analysis of the liver was performed using PAS and H-E staining for liver and pancreas; GOT and GPT were quantified by a spectrophotometric method; glycogen synthase and glycogen phosphorylase enzymes and the glucose transporter GLUT-2 were

quantified by Western blot; mRNA GLUT-2 and receptor glucagon expression was performed by RT-PCR in real time, whereas serum insulin levels were quantified by ELISA method.

The results confirm that the administration of *C. ficifolia* to healthy and diabetic mice reduces blood glucose levels and corrects some parameters characteristic of DT2, such as transaminase levels and the inflammatory profile observed in histological analysis in liver and pancreas, since the general structure of these organs was not modified compared to the diabetic group. *C. ficifolia* increased liver glycogen, suggesting that the hypoglycemic mechanism of action of the plant could be mediated in part by accumulation of glucose in glycogen form.

In this study, it was possible to isolate and identify seven major compounds present in the active aqueous extract of *C. ficifolia*, of which two are phytosterols, such as stigmasten-7,22-dien-3-ol and stigmasten-7-en-3-ol, as well as *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *o*-hydroxyphenylacetic acid and *p*-hydroxyphenylacetic acid and salicin, which have been reported with pharmacological activity and hypoglycemic effects, such as *p*-hydroxybenzoic acid. However, it is still necessary to determine which is the main active compound of the extract, or whether they are acting synergistically.

Histological analysis of liver showed an improvement in the general structure of this organ by administration with *C. ficifolia*, as well as an increase in the accumulation of glycogen. There was also an increase in glycogen synthase and decrease in glycogen phosphorylase, enzymes involved in glycogen synthesis and degradation. *C. ficifolia* represents a therapeutic alternative for the treatment of diabetes mellitus, and its hypoglycemic effect is partially due to accumulation of hepatic glycogen, since it has been shown to be capable of

generating other molecular effects associated with hypoglycemia. In addition, *C ficifolia* generates protective effect in both liver and pancreas, which could potentially help a better control of diabetes, preventing the development of vascular complications and improving the quality of life of patients.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	9
ÍNDICE.....	12
ABREVIATURAS	14
1. Introducción.....	17
1.1 Definición de la DM	17
1.1.2 Clasificación de la DM	18
1.2 Prevalencia de la DM	19
1.3 Complicaciones en la diabetes.	20
1.3.1 Complicaciones vasculares en la diabetes	20
1.3.2 Otras complicaciones en la diabetes	22
1.4 Participación del hígado en la diabetes	23
1.4.1 Glucogenogénesis y glucogenólisis	24
1.4.2 Glucólisis.....	26
1.4.3 Gluconeogénesis.....	26
1.5 Participación del páncreas en la diabetes.....	28
1.6 Tratamiento de la diabetes	31
2. Alternativas de tratamiento y plantas medicinales.....	35
2.1. Cucurbita ficifolia Bouché.....	36
4. Justificación.....	39
5. Hipótesis.....	40
6. Objetivo General	40
6.1 Objetivos Particulares	41
7. Metodología.....	41
7.1 Material vegetal	41
7.2 Obtención del extracto acuoso.....	42
7.3 Fraccionamiento químico, identificación y purificación de los compuestos de <i>C. ficifolia</i>.....	42
7.4 Animales de experimentación	45
7.5 Evaluación del efecto hipoglucémico del extracto de <i>C. ficifolia</i>	46
7.6 Estudio farmacológico	46
7.7 Cuantificación de glucógeno hepático	46
7.8 Cuantificación de los parámetros bioquímicos	47
7.9 Cuantificación de las concentraciones de insulina	47
7.10 Análisis histológico.....	48
7.11 Cultivo primario de hepatocitos y viabilidad celular	49
7.12 Determinación de la viabilidad y funcionalidad de hepatocitos	51
7.13 Extracción y cuantificación de la proteína total	52
7.14 Electroforesis de proteínas y Western Blot	52
7.15 Aislamiento y expresión del RNA de GLUT-2 y receptor de glucagón.....	54
7.16 Análisis estadístico	56
8. Resultados	56
8.1 Rendimiento y caracterización del extracto de <i>C. ficifolia</i>.....	56
8.2 Efecto de <i>C. ficifolia</i> sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa	71
8.3 Efecto de la administración diaria de <i>C. ficifolia</i> sobre parámetros bioquímicos	73

8.4 Efecto de <i>C. ficifolia</i> en el almacenamiento de glucógeno en el hígado	74
8.5 Influencia de <i>C. ficifolia</i> sobre los niveles de insulina	76
8.6 Influencia de <i>C. ficifolia</i> sobre la glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa en el hígado.....	77
8.7 Efecto de <i>C. ficifolia</i> sobre la histología en hígado.....	78
8.8 Efecto del extracto de <i>C. ficifolia</i> sobre GLUT-2 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	79
8.9 Efecto del extracto de <i>C. ficifolia</i> sobre la expresión del receptor de glucagón <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	81
8.10 Efecto de <i>C. ficifolia</i> sobre la histología pancreática.	82
9. Discusión	83
10. Conclusiones.....	90
Referencias	91

ABREVIATURAS

AGEs. Productos finales de glicación avanzada
AMPK. Proteinquinasa del monosofato de adenosina
ANOVA. Análisis de varianza
ATP. Adenosín trifosfato
ATPasa. Enzima capaz de hidrolizar ATP
ARN. Ácido ribonucleico
ARNm. Ácido ribonucleico mensajero
BSA. Ácido bicinconínico
C. Cucurbita
Ca²⁺. Calcio
CCA. Cromatografía en columna abierta
CCF. Cromatografía en capa fina
CDCl₃. Cloroformo deuterado
cDNA. Ácido desoxiribunucleico complementario
Células α. Células alfa pancreáticas
Células β. Células beta pancreáticas
Células δ. Células delta pancreáticas
CG-SM. Cromatógrafo de gases acoplado a masas
CH₃CN. Acetonitrilo
CoA. Coenzima A
CO₂. Dióxido de carbono
DM. Diabetes mellitus
DMSO. Dimetil sulfóxido
DPP-4. Dipeptidil peptidasa 4
DQI. D-quiró-inositol
DT1. Diabetes tipo 1
DT2. Diabetes tipo 2
EC. Celulas enterocromafines
EGTA. Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N',N'
FFA. Ácidos grasos libres
GIP. Polipéptido insulíntrópico
GL. Grados Gay Lussac
GLP-1. Péptido 1 similar al glucagón
GLUTs. Transportadores de glucosa
GLUT-2. Transportador de glucosa 2
GLUT-4. Transportador de glucosa 4
GK. Glucoquinasa
GOT. Transaminasa glutámico oxaloacética
GPT. Transaminasa glutámico pirúvica
GS. Glucógeno sintasa
GS3K. Glucógeno sintasa 3 quinasa
GP. Glucógeno fosforilasa
G6P. Glucosa 6 fosfato
HbA1c. Hemoglobina glicada
HCl. Cloruro de hidrógeno
HBSS. Solución salina balanceada de Hanks
H-E. Hematoxilina de Harris – Eosina amarillenta

HEPES. Ácido[N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano sulfónico]
HPLC. Cromatografía líquida de alta presión (High Performance Liquid Chromatography)
H₂O₂. Peróxido de hidrógeno
IFN-γ. Interferón gamma
IL-6. Interleucina 6
IL-10. Interleucina 10
IGEPAL. Octil fenoxi poli(etileno)etanol
IRS1. Sustrato receptor de insulina 1
K⁺. Potasio
KOH. Hidróxido de potasio
LoD. Límite de detección
LoQ. Límite de cuantificación
mGPD. Enzima glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial
Mg²⁺. Magnesio
MgCl. Cloruro de magnesio
MODY. *Madurity Onset Diabetes of the Young*
Na⁺. Sodio
NAD. Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH. Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida
NaCl. Cloruro de sodio
NaHCO₃. Bicarbonato de sodio
nm. Nanómetros
NO. Óxido nítrico
NOM. Norma Oficial Mexicana
NIST. Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
O₂⁻. Anión superóxido
·OH. Radicales libres hidroxilo
PAS. Ácido periódico de Schiff
PBS. Buffer de fosfatos
PKC. Protein cinasa C
PKB. Protein cinasa B
PI3K. Fosfatidil inositol 3 cinasa
PPARα. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa
PPARγ. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma
PP. Polipéptido pancreático
PPi. Fosforo inorgánico
PVDF. Difluoruro de polivinilideno
RMN. Resonancia magnética nuclear
RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa – tiempo real.
SFB. Suero fetal bovino
SDS. Dodecilsulfato de sodio
SIDA. Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
SSI. Solución salina isotónica
SREBP-1a. Proteína de unión al elemento regulador de esterol 1a
SREBP-1c. Proteína de unión al elemento regulador de esterol 1c
SREBP-2. Proteína de unión al elemento regulador de esterol 2
STZ. Estreptozotocina
SUR1. Receptor de sulfonilurea 1
RAGE. Receptor de productos finales de glicación avanzada

TBS. Buffer tris salino
TFA. Ácido trifluoroacético
TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa.
TZDs. Tiazolidinedionas
UDT. Uridin difosfato
UTP. Uridin trifosfato
VIP. Células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo
VIH. Virus de inmunodeficiencia humana

1. Introducción

La epidemia de la diabetes mellitus (DM) es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. Se calcula que en el mundo existen más de 415 millones de personas con diabetes y es probable que esta cifra aumente a 642 millones para el 2040 (Whitting *et al.*, 2011; IDF, 2015). La diabetes se asocia con complicaciones que afectan múltiples órganos, incluyendo la retinopatía, nefropatía y disfunción de nervios autónomos. La diabetes también se asocia con hiperlipidemia y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, así como de enfermedades vasculares periféricas que representan la mayor parte de la mortalidad en pacientes con diabetes (Roper *et al.*, 2002).

1.1 Definición de la DM

La DM es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por un estado de hiperglucemia crónica como consecuencia de defectos en la acción y secreción de insulina, además de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (ADA, 2016).

La intolerancia a la glucosa es un defecto importante en los seres humanos con DM. En respuesta a una exposición oral de glucosa, el hígado normalmente ocupa un tercio de la glucosa ingerida, mientras que los dos tercios restantes es metabolizada por otros tejidos del cuerpo. Una producción excesiva de glucosa hepática puede llevar a hiperglucemia en ayunas.

1.1.2 Clasificación de la DM

Con base fundamentalmente en su etiología y características fisiopatológicas, la DM se clasifica en cuatro tipos principales: tipo 1, tipo 2, otros tipos específicos y diabetes gestacional.

La tipo 1 (DT1) se caracteriza por la falta de insulina debido a una alteración autoinmune y destrucción de las células beta del páncreas (ADA, 2016).

La patogénesis de la diabetes tipo 2 (DT2) comprende un cuadro que va desde resistencia a la insulina hasta una disminución en la secreción de dicha hormona, como consecuencia de la disfunción progresiva de las células beta (β) del páncreas, influyendo así en el metabolismo normal de glucosa. Un aumento en la secreción de la insulina por el páncreas, se produce como un intento de mantener el metabolismo de la glucosa de forma adecuada, además de la síntesis de glucógeno hepático, cuando los niveles de glucosa en sangre se encuentran elevados y cuando los niveles de este carbohidrato son bajos y se degrada (Aschner y García, 2009; Jeong *et al.*, 2010).

Los otros tipos específicos pueden ser ocasionados por defectos genéticos en la función de las células β o en la acción de la insulina, por enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística), endocrinopatías inducidas por drogas o agentes químicos, los síndromes monogénicos de la diabetes (como la diabetes neonatal y la diabetes tipo MODY por sus siglas *Madurity Onset Diabetes of the Young*), formas poco comunes de diabetes mediadas inmunológicamente u otros síndromes genéticos asociados con diabetes (ADA, 2016).

La diabetes gestacional se presenta como una alteración en el metabolismo de carbohidratos durante el embarazo, diagnosticada en el segundo o tercer trimestre de embarazo (Aschner y García, 2009; ADA, 2016).

1.2 Prevalencia de la DM

La DM es una de las enfermedades con mayor demanda hospitalaria. A nivel mundial se encuentra asociada con cambios en el ambiente social y/o estilo de vida (Zimmet *et al.*, 2001). La prevalencia mundial de esta enfermedad entre adultos (de 20 a 79 años) en el 2010 es de 6.4%, afectando a 285 millones de adultos, y se calcula que aumentará a 7.7%, afectando a 439 millones de adultos para el año 2030, por lo que se estima que habrá un aumento del 69% en el número de adultos con diabetes durante este periodo (Shaw *et al.*, 2010).

En México la DM ha desempeñado un papel crucial, en el 2006 se registró una prevalencia del 14.4%, tanto en zonas rurales como urbanas. Presenta un mayor porcentaje en mujeres, ubicándose en 15.8%, mientras que en hombres se ubica en 13.2%. Debido a una transición epidemiológica dominado por la obesidad, la diabetes y otras enfermedades no transmisibles relacionadas con la nutrición, ocasionadas por inactividad física y cambios en la dieta. Entre 1988 y 2006, la tasa anual de prevalencia de obesidad en México aumentó en adultos en aproximadamente 2% al año, el mayor incremento documentado en todo el mundo y con ello un aumento de los costos directos destinados a los pacientes, fármacos, programas de salud pública y seguros médicos; costos indirectos atribuibles a las complicaciones de la diabetes como retinopatía, enfermedad cardiovascular, nefropatía, neuropatía y enfermedad vascular periférica (Barquera *et al.*, 2013). México ocupa el primer lugar en

número de defunciones por año a causa de la diabetes, tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales (NOM-015-SSA2-2010).

1.3 Complicaciones en la diabetes.

1.3.1 Complicaciones vasculares en la diabetes

A pesar de que la diabetes se ha catalogado como una enfermedad de origen endocrino, actualmente se puede observar que tiene manifestaciones y consecuencias vasculares, las cuales se dividen en dos grandes grupos: microvasculares y macrovasculares. Las primeras, afectan los capilares de calibre pequeño, entre las que destacan: nefropatía, que conduce a falla renal; retinopatía diabética con pérdida de la visión; y la neuropatía, con daños al sistema nervioso. Además, la neuropatía autonómica causa síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, así como disfunción sexual. Por otro lado, las macrovasculares afectan a capilares de mayor calibre, así como arterias de tamaño medio, dentro de las cuales se puede ubicar a la aterosclerosis, infarto del miocardio, accidentes vasculares encefálicos y lesiones de los vasos de los miembros inferiores (Mahía y Pérez, 2000).

Algunos mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes incluyen anomalías hematológicas, que pueden conducir a oxigenación deficiente tisular, además de un incremento en la agregación eritrocitaria con aumento de la microviscosidad y deformabilidad, niveles elevados de hemoglobina glicada

(HbA1c), cuya afinidad por el oxígeno se ve alterada, anormalidades de la función plaquetaria, incluyendo adhesividad aumentada y anormalidades en proteínas plasmáticas (Arana y Domingo, 2001).

De igual forma la aparición de alteraciones vasculares ocurre en aquellos tejidos en los que la captación de glucosa no es dependiente de la insulina, como es el caso del riñón, el tejido nervioso y vascular, y el cristalino, ya que la hiperglucemia determina un aumento de flujo de glucosa al interior celular; una parte de ésta es reducida a sorbitol por acción de la aldosa-reductasa y usa como cofactor el nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH), lo que ocasiona una disminución de éste, y como consecuencia se reduce la capacidad de defensa de la célula ante el estrés oxidativo, además de un aumento en la producción de óxido nítrico (NO). Además incrementa la relación NADH/NAD^+ , que a su vez provoca incremento en los niveles de triosa fosfato (agente de glicación muy reactivo), diacilglicerol (activador endógeno de la proteincinasa C (PKC), la cual actúa como inhibidor de la vía de señalización de la insulina, afectando tanto a su receptor como el transporte de glucosa) y una disminución en la síntesis o transporte del mioinositol que se traduce en una menor actividad de la ATPasa dependiente de sodio (Na^+) y potasio (K^+) en la membrana plasmática celular ocasionando disfunción endotelial, alteraciones en la contractilidad y permeabilidad vascular, los fenómenos de angiogénesis y cambios en la matriz extracelular, lo que finalmente conlleva al desarrollo de complicaciones crónicas de DM (Castro y Rodríguez, 2006).

1.3.2 Otras complicaciones en la diabetes

En fases más avanzadas de la enfermedad, la persistencia de estas alteraciones vasculares funcionales puede llevar a la aparición de alteraciones estructurales rápidamente irreversibles. Entre los mecanismos implicados en las complicaciones vasculares destaca la glicación de proteínas, debido a la capacidad de la glucosa y otros azúcares para formar uniones reversibles con grupos amino de las proteínas, lo que da lugar a la formación de bases de Schiff. La formación de estas bases es reversible y directamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio; posteriormente la base de Schiff sufre una reestructuración y da lugar a un producto de Amadori, ambos se conocen como los productos tempranos e intermedios de la glicación. En las proteínas con una vida media larga, estos procesos de glicación progresan hasta dar lugar a los AGEs, por sus siglas en inglés *advanced glycation end products*, los cuales juegan un papel importante en la patogénesis de complicaciones diabéticas como la retinopatía, la nefropatía, la cardiomiopatía. Los AGEs forman entrecruzamientos intracelulares y extracelulares no sólo con proteínas, sino con algunas otras moléculas clave endógenas que incluyen lípidos y ácidos nucleicos para contribuir al desarrollo de complicaciones diabéticas. Estudios recientes sugieren que los AGEs interactúan con receptores localizados en la membrana plasmática para AGE (RAGE) para alterar la señalización intracelular, la expresión génica, la liberación de moléculas pro-inflamatorias y los radicales libres (Singh *et al.*, 2014).

El aumento de radicales libres y la depleción de sistemas antioxidantes en diabetes, dan como resultado una situación de estrés oxidativo, provocando una activación de mecanismos de daño vascular.

Se tienen reportes que cambios en el metabolismo de la glucosa, tales como disminución de glucólisis, glucogénesis y el aumento de la gluconeogénesis en hígado de personas con diabetes, además de la activación de las isoformas de PKC, conducen a la disminución de la apoptosis, hiperplasia y finalmente hepatomegalia diabética (Sajad y Mohod, 2009).

Pacientes con DT2 tienen un incremento en la incidencia de aterosclerosis cardiovascular, enfermedad arterial periférica y cerebrovascular además de hipertensión y anomalías en el metabolismo de proteínas (ADA, 2016).

1.4 Participación del hígado en la diabetes

El hígado es un órgano compuesto principalmente por células del parénquima o hepatocitos (constituyen el 80%) y cuatro tipos de células parenquimatosas: endoteliales, Kupffer, Ito y células granulares. Este órgano es altamente especializado, actúa como: centro principal en el metabolismo de nutrientes, principal órgano en respuesta defensiva, controla el sistema endocrino, y reservorio de sangre. Es considerado como una glándula hepática desempeñando un papel estratégico en el proceso digestivo, al recibir nutrientes de la dieta transformándolos en biomoléculas útiles para otros órganos; ya que participa en la regulación y distribución de glucosa y glucógeno a través de la sangre a otros tejidos. Cerca de un 10-15% de peso de este órgano es compuesto por las reservas de glucógeno. Debido a sus funciones, es un órgano fundamental en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Díaz *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011).

De los carbohidratos, la glucosa es el principal combustible en el metabolismo de los mamíferos, un mantenimiento apropiado en sus niveles, es

crucial para el funcionamiento normal, mientras que la desregulación de ésta se asocia con enfermedades como DM, galactosemia y almacenamiento de glucógeno. El mantenimiento de los niveles de glucosa requiere de un gran sistema de control sensible capaz de equilibrar una amplia gama de condiciones ambientales, la más básica es la ingestión de alimentos entre intervalos irregulares. Las transiciones entre el estado de ayuno y alimentación requiere un rápido cambio entre el almacenamiento del exceso de glucosa en forma de glucógeno hepático y muscular. En un estado de ayuno el hígado descompone las reservas de glucógeno, produciendo glucosa para otros tejidos, después de la ingesta de alimentos este órgano aumenta la captación de glucosa un 26% presente a través del sistema portal (Xu *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2011). La regulación de glucosa en el hígado se lleva a cabo mediante varias vías metabólicas que controlan el almacenamiento de glucosa como de glucógeno.

1.4.1 Glucogenogénesis y glucogenólisis

El glucógeno es un polímero ramificado de glucosa que sirve como reserva de energía crítica en muchas células de bacterias y mamíferos. Se compone de cadenas de residuos de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 unidos con α -1,6 que forman los puntos de ramificación en una reacción de polimerización, donde se agregan unidades de glucosa de manera secuencial a una cadena de polisacárido creciente.

Tanto la glucogenogénesis y glucogenólisis se encuentran altamente reguladas por enzimas clave de estas vías moleculares y son la fosfoglucomutasa, glucógeno sintasa (GS) y la glucógeno fosforilasa (GP). La glucogenogénesis comienza a partir de la glucosa 6-fosfato por la

fosfoglucomutasa que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato (G6P) en glucosa 1-fosfato. La glucosa 1-fosfato se activa entonces reaccionando con UTP (uridín trifosfato), formando UDP (uridín difosfato) glucosa y pirofosfato (PPi). La GS impulsa la síntesis de glucógeno, con su actividad regulada a través de múltiples mecanismos, cataliza la formación de la polimerización primaria del enlace glucosídico α -1,4 mediante la transferencia de una porción glucosil de la UDP-glucosa a un extremo no reductor de una molécula de glucógeno con el lanzamiento de la UDP. La GP cataliza la etapa limitante en la glucogenólisis y también es activamente regulada a través de su fosforilación. Tanto la GS como la GP existen en estados activos como inactivos (Tagliabracci *et al.*, 2011; Borel *et al.*, 1989).

Esta vía exhibe diferentes comportamientos dependiendo de sus niveles. En un estado de alimentación, la glucosa es abundante en sangre y los niveles de glucógeno en el hígado son relativamente altos, lo que resulta en la activación de GS y la síntesis de glucógeno. En un estado de ayuno, los niveles en hígado son altos, se inicia la degradación de glucógeno en G6P a través de la activación de la GP para liberar glucosa al torrente sanguíneo. La movilización y la síntesis de glucógeno están reguladas principalmente por diversas hormonas, como es el caso de la insulina, el glucagón y la epinefrina (Xu *et al.*, 2011).

La GS es activada por el estimulador alostérico de G6P y por desfosforilación a través de la inactivación de glucosa sintasa 3 quinasa (GSK-3) con insulina. GS también es regulada por GSK-3, que es una serina / treonina quinasa identificada como uno de los reguladores primarios de la GS, a su vez es inactivada por insulina, a través de la activación del sustrato

receptor de insulina (IRS-1), el cual tiene como objetivo a fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y este a la proteína quinasa B (PKB), también denominada Akt, que se encuentra corriente arriba de GSK-3; esta respuesta es esencial para una respuesta normal de la insulina, ya que normalmente GSK-3 se encuentra activa (MacAulay y Woodgett, 2008).

Existen también otras vías metabólicas para mantener los niveles adecuados de glucosa como la glucólisis y la gluconeogénesis.

1.4.2 Glucólisis

La glucosa también puede ser degradada a través de una ruta glucolítica catabólica, con recuperación de la energía usada en su síntesis. En la glucólisis, la glucosa se convierte en piruvato, ácido de tres carbonos, el cual tiene varios destinos posibles, uno de los cuales es la descarboxilación oxidante para formar acetil-coenzima A (CoA), que participará en el ciclo de Krebs para formar especies reductoras. La glucólisis es una secuencia de diez reacciones catalizadas por enzimas localizadas en su mayoría en el citosol, con las que la glucosa se convierte en piruvato con la formación de dos moléculas de ATP y la producción de dos moléculas de NADH. La ruta glucolítica es activa en todos los tipos celulares y es la vía más importante para la obtención de energía (Horton *et al.*, 2008).

1.4.3 Gluconeogénesis

Es la ruta principal de biosíntesis de glucosa a partir de precursores con dos o tres carbonos. Esta ruta comparte algunos pasos con la glucólisis, sin embargo, existen cuatro reacciones específicas que difieren de las reacciones de la glucólisis. Tales reacciones son irreversibles, aunado a que el producto

principal de la ruta es la formación de nuevas moléculas de glucosa. Todos los organismos cuentan con esta ruta, incluso para los que utilizan a la glucosa exógena como fuente importante de energía (Voet y Voet, 2006; Horton *et al.*, 2008). En condiciones patológicas, como DT2, esta ruta metabólica incrementa su actividad debido a que hay resistencia a la insulina, aún en condiciones de ayuno (Schinner *et al.*, 2005).

La regulación de estas rutas metabólicas tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de glucosa, tanto en ayuno como en la ingesta de alimentos y en algunas circunstancias patológicas como la diabetes mellitus (DM). La absorción neta de glucosa hepática, está regulada por una serie de factores, incluyendo la carga de glucosa en el hígado, la concentración sinusoidal de insulina hepática y la vía de administración de glucosa en el cuerpo (Winnick *et al.*, 2011).

La glucoquinasa (GK), también llamada hexoquinasa IV es la enzima limitante de la velocidad que cataliza la fosforilación de la glucosa en las células β pancreáticas y hepatocitos. Es un componente clave en el mecanismo de detección de glucosa de los mamíferos y desempeña un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa. Mutaciones del gen de la GK se han asociado con una forma de DT2 y diabetes tipo MODY. La administración con aloxana puede perjudicar la actividad de GK en las células β pancreáticas y en el hígado (Zhang *et al.*, 2009).

Algunos de los fármacos actualmente en desarrollo activadores de GK, antagonistas del receptor de glucagón e inhibidores de GP, reducen la glucosa postprandial estimulando la captación de glucosa hepática y la deposición de glucógeno. Sin embargo, relativamente se sabe poco sobre el impacto del

contenido de glucógeno hepático en la regulación del metabolismo de la glucosa en el hígado *in vivo* (Winnick *et al.*, 2011).

Los transportadores de glucosa (GLUTs) son un grupo de proteínas de membrana altamente relacionados, que comparten secuencia homóloga entre isoformas. GLUT2 es conocido para el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática hepática de manera bidireccional. GLUT2 es regulada por glucosa, pituvato cinasa y la sintasa de ácidos grasos. En un estado de diabetes, GLUT2 en hígado y en la membrana basolateral de los túbulos renales proximales se sabe que es regulada positivamente, lo que indica que la hiperglucemia puede jugar un papel positivo en la regulación génica. Y en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, donde la insulina se agota *in vivo*, la expresión de la proteína de unión al elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c por sus siglas en inglés), está incrementada en hígado. Debido a esto, se ha postulado que la regulación positiva de GLUT2 en hígado podría ser debido a la activación del gen por SREBP-1c.

Recientemente se ha sugerido que SREBP-1c actúa como mediador de la acción de insulina en genes lipogénicos o glucoquinasa hepática. Se han identificado tres isoformas de SREBP-1a, 1c y SREBP-2. En animales con resistencia a la insulina, tales como *ob/ob*, donde se sabe que la señalización de la insulina se encuentre deteriorada, o en animales *knock-out* en la señalización de insulina, se ha reportado una sobreexpresión de SREBP-1c en hígado (Seung *et al.*, 2005).

1.5 Participación del páncreas en la diabetes

El páncreas es una glándula mixta que contiene tejido exocrino conformado por células acinares productoras de enzimas digestivas; también

presenta un tejido endocrino compuesto por varios tipos celulares de los islotes de Langerhans, que contienen hormonas que participan en la homeostasis de la glucosa: las células beta (β) productoras de insulina que representan el 70%; las células alfa (α) productoras de glucagón que representan el 20%; las células delta (δ) productoras de somatostatina que representan entre el 5 a 10% y las células productoras del polipéptido pancreático (PP), que abarca el 2%. Existen algunos tipos celulares secundarios, las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP o células DI) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromáfines); otro tipo celular encontrado en la periferia del islote es el parecido a las células neuronales Schwann, ocupando menos del 1% y que podría estar implicado en la regeneración pancreática (Olvera y Hernández *et al.*, 2008).

La insulina es sintetizada por las células β del páncreas y se secreta en respuesta a un aumento en la concentración de glucosa en sangre. Esta hormona aumenta la tasa de transporte de glucosa a los músculos y tejido adiposo a través del transportador de glucosa GLUT4, estimula la síntesis de glucógeno en el hígado e inhibe la gluconeogénesis (Horton *et al.*, 2008). Sin embargo, en condiciones de insulinoresistencia, dichos órganos no responden a la insulina de manera adecuada, conduciendo a una hiperglucemia y a un incremento en la secreción de esta hormona, compensando la reducida respuesta a la misma por parte de los tejidos, aunque sólo por un tiempo ya que finalmente se manifestará la DT2 (Schinner *et al.*, 2005).

El glucagón se secreta por las células alfa del islote, que comprende solo el 10% del volumen del islote. El glucagón es codificado por un gen prepro, el cual contiene seis exones, uno de los cuales codifica para un

precursor de glucagón y dos codifican para GLP-1 y GLP-2, respectivamente. El principal sitio de acción del glucagón es el hígado, y sus niveles elevados conducen a un aumento en sus receptores, activando la glucogenólisis hepática. El efecto del glucagón es contrario al de la insulina, por lo que en condiciones de ayuno la concentración de glucagón es alto, así como en diabetes (Taborsky, 2010).

Actualmente se usan modelos experimentales de diabetes usando diversos agentes para producir citotoxicidad en las células de los islotes. Tal es el caso de aloxana, la cual es una sustancia química utilizada para generar animales diabéticos en el laboratorio por su capacidad para destruir a las células β pancreáticas productoras de insulina, a través de la inhibición de la actividad de la enzima GK, a través de la oxidación de dos grupos tiol que se encuentran en el sitio de unión de glucosa de la enzima. Aloxana se reduce rápidamente en el cuerpo, formando ácido dialúrico, que se somete a autooxidación, produciendo cantidades detectables de peróxido de hidrógeno, el anión superóxido (O_2^-) y los radicales libres hidroxilo ($\cdot OH$); este último se produce mediante la reacción de Haber-Weiss. Estas especies y en particular el radical $\cdot OH$, son extremadamente reactivas y afectan especialmente a las células β del páncreas. Los efectos nocivos de la aloxana causan hiperglucemia debido a la inhibición rápida de mecanismo de secreción de insulina (hipoinsulinemia), daño y muerte de las células β de los islotes de Langerhans y toxicidad necrótica en las células tubulares del riñón (Sajad y Mohod, 2009).

1.6 Tratamiento de la diabetes

El tratamiento de la diabetes está dirigido principalmente a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y prevenir el desarrollo de complicaciones agudas y crónicas; las recomendaciones dietéticas en DM incluyen consumir granos enteros, verduras, frutas, productos lácteos, con énfasis en alimentos con mayor contenido de fibra y menor carga glicémica; en individuos con DT2, la proteína ingerida parece aumentar la respuesta de la insulina sin aumentar las concentraciones plasmáticas de glucosa. Considerando que los datos sobre el contenido de grasa dietética total ideal para las personas con DM no son concluyentes, un plan de alimentación que enfatiza elementos de una dieta mediterránea rica en grasas monoinsaturadas puede mejorar el metabolismo de glucosa y disminuir el riesgo de enfermedades cerebro vasculares, también se recomienda comer alimentos ricos en ácidos grasos omega 3 de cadena larga, nueces y semillas. Además, la recomendación de hacer ejercicio físico de resistencia en la diabetes busca mejorar el metabolismo de carbohidratos y la sensibilidad a la insulina (ADA, 2016).

Los individuos con DT2 no dependen de la insulina exógena para el control adecuado de la glucemia. Sin embargo, pueden llegar a requerirla si la dieta o los hipoglucemiantes orales no brindan los resultados esperados sobre la glucemia (Alberti *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que los agentes farmacológicos, tales como la metformina, los inhibidores de la alfa-glucosidasa, tiazolidinedionas, incretinas y sulfonilureas disminuyen la incidencia de la diabetes en diversos grados. La metformina tiene la base de evidencia más sólida y demostró seguridad a largo

plazo como terapia farmacológica para la prevención de la diabetes (ADA, 2016).

La metformina (N-1,1-dimetil guanidina) es un potente agente antihiper glucemiante, es de la familia biguanida y disminuye de forma aguda la producción de glucosa hepática, a través de la inhibición del complejo 1 mitocondrial de la cadena respiratoria, que a su vez activa a la enzima proteincinasa del monosofato de adenosina (AMPK), la cual monitorea el estado de energía sistémica y celular, y que desempeña un papel crucial en la protección de funciones celulares bajo condiciones de restricción energética, por lo que las células de un estado anabólico pasan a un estado catabólico, cerrando rutas. Metformina reduce la producción hepática de glucosa al inhibir la enzima glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPD) y por consiguiente la inhibición de gluconeogénesis (Hur y Lee, 2015). Metformina inhibe la glucólisis aeróbica en el músculo esquelético y favorece la glucólisis anaeróbica, por lo tanto incrementa el consumo de glucosa por este órgano, además disminuye levemente la absorción intestinal de glucosa y puede favorecer la pérdida de peso, también es considerada como un sensibilizador de insulina dirigiendo la reducción de resistencia a la insulina. Los efectos adversos por el uso de este fármaco incluyen síntomas gastrointestinales (diarrea, náuseas, alteraciones abdominales, anorexia) y puede disminuir la absorción de vitamina B12 y el ácido fólico (Violet *et al.*, 2012).

Las tiozolidinedionas (TZD) o glitazonas son consideradas fármacos antidiabéticos en el control de diabetes tipo 2, se consideran también sensibilizadores a la insulina ya que reducen la resistencia a la insulina en el tejido adiposo y músculo. Los factores potenciales de señalización incluyen los

ácidos grasos libres (FFA) (mediadores de la resistencia a la insulina vinculada a la obesidad), o el factor de necrosis tumoral alfa derivado de adipocitos (TNF- α), que está sobreexpresado en resistencia a la insulina y obesidad. TZD activa al receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ), una vez activado altera la transcripción de varios genes implicados en el metabolismo de glucosa y los lípidos en el metabolismo energético, incluyendo los que codifican para la lipoproteína lipasa, proteína transportadora de ácidos grasos, proteína de unión a ácidos grasos adipocíticos, glucoquinasa y el transportador de glucosa 4 (GLUT4). Actualmente se usa la pioglitazona como TZD (Hauner, 2002).

Las sulfonilureas funcionan como secretagogos de insulina por las células β pancreáticas y este efecto es acompañado posteriormente de una disminución en la depuración hepática de insulina. Las sulfonilureas actúan al unirse al receptor específico de las sulfonilureas en las células β pancreáticas, bloqueando la entrada de K^+ a través del canal dependiente de ATP, el flujo de K^+ dentro de la célula pasa a cero, la membrana celular se despolariza y aumenta el flujo de calcio (Ca^{+}) lo que provoca la contracción de los filamentos de la actomiosina responsables de la exocitosis de gránulos de insulina, que es rápidamente secretada en grandes cantidades, de aquí que entre sus efectos adversos más frecuentes se encuentren las hipoglucemias. Existen sulfonilureas de primera generación: tolbutamida, tolazamida y clorpropamida y las de segunda generación con mayor potencia y mejores resultados farmacocinéticos como la glibenclamida, gliburide, glicazida y glipizida, y la llamada de tercera generación glimepirida (Sola *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2011).

Los inhibidores de la alfa-glucosidasas como la acarbosa actúan competitivamente y reversible sobre las alfa glucosidasas intestinales (alfa-amilasa, isomaltasa, maltasa, glicoamilasa y lactasa), retrasando la digestión de los carbohidratos, prolonga el tiempo total de digestión de los carbohidratos y por lo tanto reducen la velocidad de absorción de glucosa, además de que reduce la absorción de triglicéridos en el tejido adiposo y la lipogénesis hepática. Los efectos no deseados de los inhibidores de la alfa-glucosidasas incluyen flatulencia, diarrea y dolor abdominal (Kaira, 2014).

Por otro lado las incretinas como la sitagliptina, inhiben a la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), la enzima responsable de la escisión N-terminal y la inactivación de los péptidos de incretinas, principalmente GLP-1 (péptido 1 similar al glucagon) y GIP (polipéptido insulínico), los cuales aumentan la secreción de insulina en el islote de Langerhans, confieren sensibilidad a la glucosa a las células β resistentes a glucosa, estimulan la proliferación y neogénesis de las células β e inhiben su apoptosis, además regulan la motilidad intestinal, el apetito y el peso corporal. Ambos péptidos son secretados por las células L enteroendócrinas del intestino delgado y grueso (Campbell y Drucker, 2013).

Este tipo de fármacos ha mostrado resultados excelentes sobre el manejo de hiperglucemia, sin embargo algunos producen fatiga pancreática, problemas intestinales, daño hepático o insuficiencia renal, lo que conduce al paciente a tomar medidas de remplazo hormonal, o pocos pacientes entienden la importancia de las modificaciones del estilo de vida, los hábitos alimentarios, y el ejercicio como parte de su tratamiento.

2. Alternativas de tratamiento y plantas medicinales.

Aunque el uso clínico de los fármacos hipoglucemiantes es amplio, gran parte de éstos producen efectos secundarios indeseables. Además de que su principal objetivo es disminuir los niveles de glucosa en sangre y ocasionalmente disminuir las complicaciones vasculares. Por ello, la humanidad requiere de alternativas terapéuticas que no sólo se enfoque en los niveles de glucosa, sino que eviten el desarrollo de complicaciones vasculares. Dentro de las fuentes alternativas para el descubrimiento de agentes terapéuticos se encuentran las plantas medicinales, las cuales son ampliamente recurridas por la población mundial como un tratamiento alternativo o complementario de la enfermedad.

Así por ejemplo, en estudios fitoquímicos con el fruto de varias plantas pertenecientes a la familia *Cucurbitaceae* (*Cucurbita pepo* L. y *Momordica charantia* L.) se han aislado cucurbitaglicósidos con actividad citotóxica (Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). También se han identificado y aislado otros componentes, como el ácido ascórbico, beta y alfa-carotenoides, etc., que podrían tener propiedades antioxidantes y podrían ser útiles en el tratamiento de diversas patologías (Hancock *et al.*, 2008; Azevedo y Rodríguez, 2007). En otras cucurbitáceas, como en *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir, se han identificado polisacáridos compuestos por glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ramnosa; estos polisacáridos se probaron en cultivos de macrófagos mostrando efecto antioxidante. También se han aislado compuestos tipo cucurbitacinas, los que han sido propuestos con efecto antiinflamatorio en ratones y ratas con inflamación local (Chen *et al.*, 2005; Recio *et al.*, 2004).

En nuestro país durante mucho tiempo se han utilizado plantas medicinales de manera empírica con diferentes efectos farmacológicos (Alarcón *et al.*, 2002). De hecho, en México se tienen reportes del uso de más de 350 plantas para el control empírico de la DT2 (Andrade y Heinrich, 2005). Una de las plantas utilizadas es *Cucurbita ficifolia* Bouché, conocida popularmente como “chilacayote”. Se le han dado diferentes usos: el fruto inmaduro es usado para preparar diversos platillos para el consumo humano, mientras que el fruto maduro es usado para preparar dulce cristalizado.

El fruto maduro de *Cucurbita ficifolia* (*C. ficifolia*) es similar a una pequeña calabaza blanca que mide de 8 a 10 cm de diámetro; tiene una delgada cáscara verde, con manchas blancas. Así mismo, la población le ha atribuido ciertas características curativas en heridas, hemorroides, fiebre, dolores y en desórdenes inflamatorios, así como para el control de la DM.

2.1. Cucurbita ficifolia Bouché.

C. ficifolia ha mostrado actividad hipoglucemiante en diversas condiciones experimentales (Alarcón *et al.*, 2002). La actividad hipoglucemiante del fruto de *C. ficifolia* ha sido estudiada a nivel experimental en ratas, ratones y conejos. En conejos con diabetes experimental inducida por aloxana a diferentes dosis, para inducir en estos animales diabetes moderada (glucemias entre 150-300 mg/dL) y severa (glucemia mayor a 300 mg/dL). Se administró el jugo del fruto de *C. ficifolia* a una dosis de 4 ml/kg, disminuyendo significativamente la glucemia en conejos con diabetes moderada (Román *et al.*, 1992).

Estudios realizados en ratones sanos, se observó efecto hipoglucémico por vía intraperitoneal y oral. En otro estudio, la administración diaria por vía oral del jugo de *C. ficifolia* por 14 días a ratones tratados con aloxana produjo una disminución significativa de la glucemia (Alarcón *et al*, 2002). En pacientes con DT2, con glucemias entre 150-300 mg/dL y que recibieron el jugo de *C. ficifolia* (4 ml/kg), se observó disminución de la glucemia después de 3 h de haber sido ingerido el fruto (Acosta *et al.*, 2001).

También se han realizado estudios toxicológicos agudos con el jugo liofilizado de *C. ficifolia* en ratones, reportándose una dosis letal 50 (DL₅₀) por vía intraperitoneal de 625 mg/kg y por vía oral de 3689 mg/kg (Hernández *et al.*, 2002). Por tal motivo los estudios subsecuentes se realizaron utilizando una dosis de 200 mg/kg por vía oral, para tener un margen de seguridad amplio.

En el 2006, Xia y Wang aislaron un compuesto a partir del extracto metanólico de *C. ficifolia*, el D-quiró-inositol (DQI), el cual mostró efecto hipoglucémico usando 10 a 20 mg de DQI en ratas tratadas con estreptozotocina. Los autores evaluaron un extracto de *C. ficifolia* durante 30 días por vía oral, con 10 a 20 mg/kg de DQI. El extracto incrementó los niveles de glucógeno hepático, la hemoglobina total y los niveles de insulina, pero generó descenso en los niveles de glucosa (Xia y Wang, 2006b).

En estudios recientes se ha determinado que la administración de *C. ficifolia* (200 mg/kg) disminuye los niveles de malondialdehído (producto de lipoperoxidación) y aumenta el glutatión reducido (antioxidante endógeno) en hígado de ratones diabéticos. A esta misma dosis, *C. ficifolia* disminuye los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e incrementa interferón

gamma (IFN- γ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) en plasma de ratones con diabetes inducida con estreptozotocina (Román *et al.*, 2012). Así mismo, en el laboratorio de farmacología de la UAM-I se ha determinado que, a la misma dosis, *C. ficifolia* aumenta la expresión de receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α) y disminuye la expresión de PPAR γ en hígado de ratones con diabetes inducida con STZ.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la administración de un extracto acuoso de *C. ficifolia* (1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en músculo liso vascular, el cual no bloqueó los canales de K⁺ dependientes de ATP, por lo que el efecto de *C. ficifolia* no parece estar asociado a la secreción de insulina, mecanismo característico de las sulfonilureas (Banderas *et al.*, 2012).

En estudios histológicos recientes en ratones con diabetes experimental inducida con estreptozotocina tratados con *C. ficifolia*, se observó una mayor densidad celular aparente en los islotes pancreáticos respecto al control; el grupo diabético mostró un aspecto disgregado y fibrótico, incipiente de islotes pancreáticos, al igual que el control positivo (grupo diabético tratado con pioglitazona); en cuanto a la histología de corazón, riñón e hígado, los ratones tratados con *C. ficifolia* y pioglitazona mostraron respuesta macrofágica en vasos sanguíneos. En otro estudio histológico realizado con una tinción histoquímica de ácido periódico de Schiff (PAS) en cortes de hígado de ratones con diabetes experimental tratados con *C. ficifolia*, se observó una mayor acumulación homogénea de glucógeno en el parénquima hepático respecto al control, además de tener efecto sobre la proliferación de la célula β pancreática y aumento de insulina en ratones diabéticos (García, 2011).

Considerando estas evidencias se puede suponer que el mecanismo de acción por medio del cual *C. ficifolia* produce efecto hipoglucémico es a través de la acumulación de carbohidratos, específicamente glucógeno en el hígado, así como en las células β de los islotes pancreáticos. Sin embargo aún falta confirmar esas observaciones y evaluar el efecto directo de *C. ficifolia* sobre la vía glucogenogénica, mediante un estudio cuantitativo de este carbohidrato, así como de las enzimas y reguladores implicados en la glucogenogénesis, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como a través del análisis ultra estructural de hígado y páncreas.

4. Justificación

La DM representa uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial. Se trata de una enfermedad crónico-degenerativa con complicaciones fatales e inevitables que afecta de manera grave a la economía nacional. En la actualidad se carece de un tratamiento eficaz que, sobre todo, disminuya el riesgo de desarrollar complicaciones vasculares, lo cual justifica la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.

Hasta el día de hoy no se ha encontrado un tratamiento adecuado para el control de la hiperglucemia y, sobre todo, aún se carece de un control idóneo tanto de la glucotoxicidad como de las complicaciones vasculares originadas principalmente por un proceso inflamatorio en la DM. Por tal motivo, surge la necesidad de investigar sobre nuevas fuentes potenciales de sustancias capaces de mejorar los niveles plasmáticos de glucosa, así como retrasar el desarrollo de complicaciones vasculares mediante la disminución del estado proinflamatorio, sin fatigar la funcionalidad pancreática.

Se tienen evidencias experimentales de *C. ficifolia* sobre el efecto hipoglucémico, toxicidad aguda e incluso se conocen algunas sustancias químicas responsables del efecto hipoglucémico. Así mismo, en los resultados obtenidos en la maestría se observó un incremento de las concentraciones de insulina, así como de CDK4 (un marcador de proliferación celular) en los islotes pancreáticos, sin alterar la morfología de este órgano.

Además, *C. ficifolia* tendió a mantener la estructura general de hígado y riñón, y modificó la distribución de glucógeno hepático, sugiriendo que el mecanismo de acción de la planta podría estar mediado tanto por un aumento de células β pancreáticas, como por la vía de síntesis de glucógeno, por lo que *C. ficifolia* podría producir efectos sobre marcadores enzimáticos y hormonales implicados en la ruta de la síntesis de glucógeno hepático, o sobre la ultraestructura del páncreas, aunque efectos tóxicos en otros órganos por administración crónica del extracto no pueden ser descartados.

5. Hipótesis

La acción hipoglucemiante de un extracto caracterizado químicamente de *Cucurbita ficifolia* Bouché está mediada por cambios en algunos marcadores importantes en la síntesis y degradación de glucógeno hepático, manteniendo una estructura y organización celular adecuada tanto en hígado como en páncreas.

6. Objetivo General

Caracterizar químicamente un extracto acuso de *C. ficifolia* Bouché y demostrar que su efecto hipoglucémico ocurre a través de la modificación de

marcadores que regulan la síntesis de glucógeno hepático, preservando la morfología histológica en hígado y páncreas.

6.1 Objetivos Particulares

6.1.1 Determinar el efecto hipoglucémico del extracto de *C. ficifolia*.

6.1.2 Caracterizar químicamente el extracto acuoso activo de *C. ficifolia*.

6.1.3 Determinar el efecto de *C. ficifolia* sobre el almacenamiento de glucógeno *in vivo*.

6.1.4 Determinar las modificaciones producidas por *C. ficifolia* sobre la arquitectura en hígado y páncreas.

6.1.5 Determinar el efecto de *C. ficifolia* sobre los niveles de insulina en ratones diabéticos.

6.1.6 Evaluar el efecto de *C. ficifolia* sobre enzimas implicadas en la vía de la glucogenogénesis y glucogenólisis (GSy GF) en hígado *in vivo*.

6.1.7 Evaluar el efecto de *C. ficifolia* en los niveles de expresión de GLUT 2 y receptor de glucagón en hígado *in vivo* e *in vitro*.

7. Metodología

7.1 Material vegetal

El fruto maduro de *C. ficifolia* fue colectado en San Bartolo el Chico, Acolman, Estado de México (coordenadas: latitud 19.6488° N y longitud 98.8956° E, fecha de colecta marzo 2012). La identificación taxonómica se realizó por medio del cotejo de ejemplares del herbario de plantas medicinales (Herbario-IMSSM, con número de espécimen 11119).

7.2 Obtención del extracto acuoso

La obtención del extracto acuoso de *C. ficifolia* se realizó eliminando la cascara al fruto maduro, se retiró el bagazo y las semillas; se cortó en rebanadas delgadas y se colocó en un recipiente para su deshidratación a temperatura ambiente con aireación constante. Una vez seco el material, se trituró en un molino eléctrico tipo Wiley, modelo 4, usando una rejilla metálica de 1 mm de diámetro. Se tomaron 100 g del fruto seco de *C. ficifolia* y se sometió a una maceración con agua (1 L) durante 72 h dentro de una campana de flujo laminar y cada 24 h se recuperó la fase acuosa, para someterla a un proceso de liofilizado (8 h/día). El producto resultante se utilizó en el experimento usando como vehículo solución salina isotónica (SSI). Las condiciones de almacenamiento fueron a -70°C.

7.3 Fraccionamiento químico, identificación y purificación de los compuestos de *C. ficifolia*.

El fraccionamiento, identificación y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en *C. ficifolia* se realizó empleando varios métodos de separación y usando técnicas espectroscópicas y espectrométricas para la elucidación química estructural, con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto.

El extracto de *C. ficifolia* se separó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) para la obtención de algunos compuestos presentes. Se utilizaron columnas fase reversa y fase normal. La columna fase reversa fue empacada con 10 g de silica gel POLYGOPREP® 60-50 C₁₈ (fase reversa, MACHEREY-NAGEL) y se activó con metanol y la fase móvil consistió en una mezcla de agua (Merck) y acetonitrilo (TECSIQUIM) a diversas proporciones.

Se realizaron colectas y cada una se concentró en un rota evaporador y se compararon por cromatografía en capa fina (CCF).

La columna fase normal fue empacada con 10 g de sílica gel 60 (fase normal, Merck) y se activó con metanol y la fase móvil consistió en una mezcla de hexano/acetato de etilo a diferentes proporciones. Se realizaron colectas y se concentraron en el rota evaporador y fueron comparadas por CCF.

En CCF se utilizaron placas de cromatofolios de aluminio recubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Fase Normal, 1.05554.001, Merck) y como fase móvil una serie de mezclas isocráticas de diferentes disolventes (v/v) según la muestra a tratar) y según la polaridad de las muestras analizadas. También se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos de sílica gel 60 RP-18 F254S (Fase reversa, 1.05559.0001, Merck) y como fase móvil agua/acetonitrilo (C) (v/v). Las placas se analizaron con una lámpara de luz ultravioleta (UVGL-58, UVP, Cambridge, UK) a 254 y 365 nm antes y después del tratamiento con reveladores químicos. Después de aplicar el revelador, las placas se colocaron en una parrilla a 90°C durante 5 s y se observaron en una cámara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm.

En la detección de los compuestos presentes en *C. ficifolia* se utilizaron reveladores químicos como el reactivo de solución de 4-hidróxibenzaldehído (Merck), y solución NP/PEG que contiene difenilboriloxietilamina y polietilenglicol.

Para establecer el perfil químico del extracto, así como de los compuestos aislados del extracto de *C. ficifolia* se empleó HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), equipado con un módulo de separación (Waters 2695) y un detector de arreglo de diodos (Waters),

utilizando el software Empower Pro. La separación se realizó usando una columna prevail C-18 (150 x 4.6 mm; 5 μ m; Grace). La fase móvil consistió en una mezcla de solución de ácido trifluoroacético (TFA) (0,5%, disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) en las siguientes relaciones: A: B = 100: 0 (0-2 min); 90:10 (3-5 min); 85:15 (6-10 min); 80:20 (11-12 min); 70:30 (13-14 min); 50:50 (15 min); 0: 100 (16 a 18 min); 100: 0 (19 a 24 min). El volumen de inyección de muestra fue de 10 μ L con un caudal de 1 ml/min durante 24 min. La longitud de onda de detección fue a 190-600 nm.

Se usaron estándares comerciales (Sigma Aldrich) de ácido *p*-cumárico, ácido gálico, catequina, nicotinamida y rutina, se compararon con el extracto acuoso en estas condiciones cromatográficas. La cuantificación de ácido *p*-cumárico se logró utilizando una curva de calibración con concentraciones ascendentes (25, 50, 100 y 200 μ g / ml) y se inyectaron (10 μ L) de acuerdo con el método de HPLC descrito anteriormente.

Para la detección del contenido de DQI se usó un detector de índice de refracción Waters 2697, una columna LiChrospher amino (NH₂) 5 μ m (4 x 250mm, 100 A°; Merck Millipore), y como fase móvil una serie de mezclas isocráticas de acetonitrilo (CH₃CN)/agua en proporción 80:20 por 20 min, con un flujo de 1 ml/min durante 20 min. La curva estándar de DQI se preparó con concentraciones ascendentes (12, 16, 22.5, 30 y 50 μ g/ml).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en un espectrómetro Agilent DD2 600 (Agilent Technologies), a 600 MHz para H¹ NMR, H¹-H¹ COSY, HSQC, HMBC y a 150 MHz para C¹³ RMN en cloroformo deuterado (CDCl₃) o dimetilsulfóxido (DMSO). Los desplazamientos químicos

se expresaron en partes por millón (ppm); se usó tetrametilsilano (TMS) como referencia.

También se empleó un cromatografo de gases acoplado a masas (CG-SM) (Agilent Technology 6890) equipado con un detector de masas cuádruple en modo de impacto de electrones a 70 eV. Los compuestos volátiles fueron separados en una columna capilar HP 5MS (25 m de longitud, 0.2 mm i.d., 0.3 μ m del espesor de la película). La temperatura del horno se fijó en $^{\circ}$ C durante 2 min y luego se programó para aumentar de 40 a 260 $^{\circ}$ C a 10 $^{\circ}$ C/min, manteniendo durante 20 min. Las condiciones del detector de masas fueron las siguientes: una temperatura de interfase de 200 $^{\circ}$ C y un intervalo de adquisición de masa de 20 a 550. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron a 250 y 280 $^{\circ}$ C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador (velocidad de flujo de 1 ml/min). Identificación de los volátiles se realizó mediante la comparación de sus espectros de masa con los del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) 1.7 Biblioteca.

7.4 Animales de experimentación

Se usaron ratones *Mus musculus*, cepa CD-1 (Harlan), machos (30-35 g), del bioterio de la UAM Iztapalapa, manteniéndolos con una dieta básica para roedores y ciclo de luz/oscuridad por 12 h. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura ambiente de 24 $^{\circ}$ C. El manejo de los animales de laboratorio se llevó a cabo de acuerdo con los estatutos por Comité de Ética Institucional de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Ciudad de México (CDCBS.127.08) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999, revisada en 2001).

7.5 Evaluación del efecto hipoglucémico del extracto de *C. ficifolia*

Para evaluar el efecto hipoglucémico del extracto de *C. ficifolia* se formaron 3 grupos de ratones normoglucémicos en ayunas con 10 animales cada grupo: el grupo 1 recibió 4 ml/kg de solución salina; el grupo 2 recibió una dosis de 200 mg/kg de *C. ficifolia*; el grupo 3 recibió tratamiento de glibenclamida (5 mg/kg), todos por vía intragástrica y se monitoreó la concentración de glucosa en sangre a 0, 120, 240 y 360 min, usando un glucómetro Accu chek Sensor de confort (Roche Diag).

7.6 Estudio farmacológico

Una vez corroborado el efecto hipoglucémico del extracto, se continuó con el tratamiento subcrónico de la administración de *C. ficifolia*, en ratones con diabetes experimental mediante la administración intravenosa de aloxana en dos dosis alternas (70 mg/kg) disuelta en SSI. Se formaron 4 grupos para el ensayo biológico con 8 animales cada grupo: el grupo 1 recibió 4 ml/kg de SSI (control normoglucémico); el grupo 2 recibió 4 ml/kg de solución salina (control negativo), el grupo 3 recibió una dosis de 200 mg/kg del extracto acuoso de *C. ficifolia*; y el grupo 4 recibió tratamiento de metformina (50 mg/kg), todos por vía intragástrica, por un periodo de 30 días, de los cuales los grupos 2, 3 y 4 fueron a los grupos a los cuales se les indujo diabetes experimental.

7.7 Cuantificación de glucógeno hepático

El glucógeno se extrajo mediante la digestión del tejido hepático con 30% de KOH, seguido de precipitación con etanol 95%. Se realizó una curva estándar de glucógeno (Sigma Aldrich) y se leyó a 620 nm. Las muestras se diluyeron 1:50 en agua destilada. Los resultados reflejan la absorbancia

obtenida y se expresan como mg de glucógeno por g de hígado seco (Passonneau y Lauderdale, 1974; Stryer *et al.*, 2003).

7.8 Cuantificación de los parámetros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos se cuantificaron a partir de las muestras de sangre obtenidas a partir del seno retro-orbital de ratones anestesiados. Para medir la glucemia se utilizó un Accu-Check Sensor de Confort (Roche Diag.). La determinación cuantitativa de triglicéridos, transaminasa glutámico pirúvica (GPT) y transaminasa glutámico oxaloacética (GOT) se realizó mediante el sistema Reflotron Plus (Roche Diag). Esta técnica se basa en una reacción enzimática a través de diferentes fases de reacción, produciendo la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual se oxida bajo efecto catalítico de la enzima peroxidasa, produciendo agua, la cual reacciona con un colorante azul (indicador redox) y se mide a 642 nm a 37°C. Estos parámetros se cuantificaron al final de los tratamientos (30 días).

7.9 Cuantificación de las concentraciones de insulina

La concentración de insulina se realizó usando la metodología descrita por el proveedor (Lynco Research). Esta técnica se basa en la formación de un complejo formado por la proteína de interés que se une a un anticuerpo monoclonal previamente cargado en una placa de 96 pozos; posteriormente se le une una enzima peroxidasa de rábano y finalmente un sustrato. La actividad enzimática se midió en un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 450 y 590 nm. El incremento de absorbancia fue directamente proporcional a la cantidad de proteína.

7.10 Análisis histológico

Los órganos considerados para el estudio histológico se obtuvieron al final de los tratamientos (30 días) en los cuatro grupos de ratones; se anestesiaron con éter y se sacrificaron tomando en cuenta los criterios del comité de ética local, así como la norma oficial mexicana para el manejo de animales (NOM-062-ZOO). Se extrajeron muestras de hígado y páncreas, los cuales fueron fijados con paraformaldehído durante 18 a 24 h y procesados con técnica histológica estándar. Finalmente se incluyeron con Paraplast Plus y se realizaron cortes histológicos seriados de 5 µm en plano longitudinal en páncreas y transversal en hígado.

Los tejidos se sometieron a tinción de hematoxilina-eosina (H-E) y se realizó mediante el siguiente esquema: las muestras fueron tratadas con Neoclear por 5 minutos (dos repeticiones), etanol al 100° Gay Lussac (GL) por 5 minutos (dos repeticiones), etanol-éter al 100° GL con proporción 1:1 por 2 minutos, etanol al 96° GL por 2 minutos, etanol al 60° GL por 2 minutos, una vez con agua destilada, se tiñó con hematoxilina por 4 minutos, se lavó una vez con agua corriente, etanol al 70° GL y ácido clorhídrico; se lavó con agua destilada, se mantuvo en solución Scott por 8 minutos, se hizo un lavado con agua destilada, se tiñó con eosina por 3 minutos, se lavó con agua destilada, etanol al 96° GL, etanol al 100° GL, etanol-xileno 1:1, xileno (dos repeticiones) y enseguida se montaron con entellan, cubriendo con un portaobjetos (Presnell y Schreibcam, 1997). Una vez que se montaron todas las laminillas, se realizó el análisis de las muestras en el microscopio Axioskope II (Carl Zeiss) y el analizador de imágenes de campo claro (Axiovision 4.5, Carl Zeiss). La

digitalización de las fotomicrografías se tomaron con una cámara AxioCamMRc5 (Carl Zeiss).

Por otro lado, se realizó la tinción de Ácido Periódico de Schiff (PAS), la cual identifica hidratos de carbono y compuestos relacionados, dentro de los que destaca el glucógeno (Torres, 2002). La técnica se realizó mediante el siguiente esquema de tinción: el tejido se desparafinó e hidrató hasta llegar a agua destilada, el tejido se oxidó en la solución de ácido periódico durante 5 minutos, se enjuagó con agua destilada, se colocó en el reactivo de Schiff de Coleman durante 5 minutos, se lavó con agua corriente tibia durante 10 minutos, el tejido se contrastó con la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos, se lavó con agua corriente durante 15 minutos, después se deshidrató y aclaró con etanol al 95° GL, etanol al 100° GL y xileno, 2 cambios de 2 minutos cada uno, y finalmente se montaron las laminillas con entellan. El glucógeno en hígado se tiñó de color rosa intenso (Prophet *et al.*, 1995).

Las muestras histológicas, se analizaron por animal a razón de diez cortes de 5 µm de espesor por órgano en regiones morfológicas equiparables. Se revisaron diferentes campos con una densidad de 560 a 100 µm por muestra y 400 aumentos totales por órgano y teñidos con PAS para determinar la acumulación de glucógeno en el parénquima hepático. Se usó la misma metodología para determinar el número de células inmunotefidas con el programa de análisis de imágenes AxioVision Rel 4.8 (Zeiss Software Inc).

7.11 Cultivo primario de hepatocitos y viabilidad celular

El aislamiento de hepatocitos se realizó por la técnica de doble perfusión con colagenasa (Papeleu *et al.*, 2006). Se usaron ratones machos de la cepa

CD-1 de entre 8 y 10 semanas de edad y se anestesiaron intraperitonealmente utilizando 0.7 ml de Avertina. La superficie abdominal se lavó con etanol 70%, y se procedió a hacer una incisión en el abdomen y tórax para dejar expuesto el hígado y corazón, para introducir un catéter Abbocath 22G acoplado a un equipo de perfusión el atrio derecho del corazón. La vena cava inferior se anudó con hilo de sutura para evitar el paso de las soluciones utilizadas hacia los riñones, posteriormente se seccionó la vena porta para abrir la circulación. Se perfundió el hígado usando aproximadamente 30 ml de solución salina balanceada de Hanks (HBSS) libre de Ca^{2+} , Mg^{2+} y rojo de fenol que contenía ácido[N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano sulfónico] (HEPES) 10 mM, pH 7.4 y ácido etilenglicol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N',N' (EGTA) 75 mM a pH 7.4 a 37 °C. La velocidad de la perfusión se controló con una bomba peristáltica a 3.8 ml/min y a una temperatura de 37 °C. En el segundo paso de la perfusión se utilizó 50 ml de Colagenasa tipo I (Sigma) a una concentración de 0.1% en Medio Williams (Sigma) con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 25 mM (J.T.Baker) y amortiguado con HEPES 10 mM (Gibco) a pH 7.4. Posterior a la colagenasa se disectó el hígado y se colocó en una caja de Petri de 10 cm de diámetro con 50 ml de medio Williams frío suplementado con suero fetal de bovino (SFB) (Hyclone) al 10%, 1% antibiótico-antimicótico (Gibco) (como medio de adhesión). La cápsula de Glisson, membrana de tejido conectivo que rodea al hígado, se rompió utilizando 2 pipetas estériles de 1 ml, con lo que se disgregaron las células hepáticas y se obtuvo una suspensión celular que se hizo pasar por un filtro con un tamaño de poro de 100 μm . El filtrado se centrifugó a 28 g durante 5 min a 4°C. Para después succionar el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 25 ml de medio de adhesión frío. A esta

suspensión celular se le depositó una solución de Percoll (Sigma) que contenía amortiguador solución salina balanceada de Hanks10X (Gibco) y ambas fases se homogenizaron suavemente invirtiendo 3 veces y posteriormente se centrifugó a 170 g durante 15 min a 4 °C, obteniéndose un pellet compuesto por hepatocitos viables. El sobrenadante se succionó y las células se resuspendieron en 20 ml de medio de adhesión frío. Una alícuota de 100 µl se utilizó para contar las células en un contador automático Vi-Cell (Beckman Coulter), usando tinción con azul tripano. Las células se sembraron en cajas de petri con 6 cm de diámetro con una densidad de 36000 células/cm² y se incubaron a 37 °C en una atmósfera que contenía 5% de CO₂. Después de que los hepatocitos se adhirieron (4 horas aproximadamente), se les cambió el medio de adhesión por Medio Williams con antibiótico y antimicótico, sin suero fetal bovino y se procedió a poner los distintos tratamientos a diferentes tiempos.

7.12 Determinación de la viabilidad y funcionalidad de hepatocitos

El tratamiento con el extracto de *C. ficifolia* (0.02 µM) y metformina (1 mM) se realizaron a diferentes concentraciones dependiendo del ensayo de funcionalidad mediante el uso del kit CellTiter96 (Promega), tomando en cuenta una funcionalidad superior al 95%. Los hepatocitos se sembraron en placas de 96 pozos y se dejó estabilizar el cultivo por 24 h. Después de ese tiempo se cambió el medio por un medio de cultivo sin SFB adicionando en cada pozo 100 µL y 10 µL de CellTiter96 y se incubó por 30 min en condiciones estándar de cultivo celular. El ensayo consistió en la reducción de una sal soluble de tetrazolio WST-8 mediante deshidrogenasas en la célula, lo cual es proporcional al número de células viables, que da como producto un color

naranja, el cual se lee a 480 nm en un detector multimodal de placas DTX 880 (Beckman Coulter, Inc.). Se extrajo RNA total y proteína total a los diferentes tratamientos y a distintos tiempos.

7.13 Extracción y cuantificación de la proteína total

Se tomaron aproximadamente 10 mg de tejido hepático y se homogenizaron en 1 ml de PBS; posteriormente se centrifugó a 8900 g durante 1 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió en 200 µL de amortiguador de lisis M-PER (Pierce Biotechnology) pH 8.0, formado por Tris-hidrocloruro (HCl) 50 mM, cloruro de sodio (NaCl) 120 mM, octil fenoxi poli(etileno)etanol (IGEPAL) 0.5%, fluoruro sódico (NaF) 100 mM, NaOV₃ 200 mM, (Sigma) y 80 µl de un stock de inhibidor de proteasas Complete (Roche Diagnostics). El homogenado celular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar 15 min a 4°C. Después fue centrifugado a 17000 xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de proteína total mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó una alícuota de 5 µL de las muestras y se agregó 200 µL de reactivo de BCA diluido 1:50 y se incubó por 30 min a 25 °C. Se realizó una curva patrón con BSA (0.1-0.5 mg/mL). Posteriormente, se leyó la absorbancia en el detector multimodal (DTX880) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de BSA (Domínguez *et al.*, 2016).

7.14 Electroforesis de proteínas y Western Blot

El ensayo de Western Blot se realizó de acuerdo con el método descrito por Preston *et al* (1996), el cual se basa en la identificación de la proteína

citoplásmica por medio de la unión específica con un anticuerpo primario y el reconocimiento de este anticuerpo por un segundo anticuerpo que lleva una marca fluorescente para mostrar que se encuentra presente.

La separación electroforética se realizó con 100 µg de proteína y se le agregó un amortiguador de muestra 2X (Laemmli simple buffer, Bio Rad). Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1%, en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, BioRad), usando un voltaje de 120 V durante 90 min, posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de difloururo de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen), durante 2 h a 120 V en un sistema transblot (Biorad).

La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en tris buffer salino (TBS)-tween durante 1 h en agitación constante, después se realizaron dos lavados con TBS-tween por 10 min en agitación constante y se incubó durante toda la noche en agitación constante a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos que se enlistan en la Tabla 2. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces en TBS-tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology), diluido en una solución de albúmina en TBS-Tween por 90 min. Después se lavó 2 veces por 10 min en TBS-Tween y 1 vez con TBS por 5 min. Se reveló utilizando el sustrato de alta sensibilidad immobilon (Millipore). Se detectó la luminiscencia y se cuantificaron las bandas usando el equipo Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak) (Domínguez *et al.*, 2016).

Tabla 1. Anticuerpos empleados en Western Blot				
	Anticuerpo	Peso Molecular (kDa)	Anticuerpo secundario	Marca
1	Actina	43	Ratón	Sigma A3854
2	Glucógeno sintasa	81	Ratón	Abcam EP917Y
3	Glucógeno fosforilasa	97		Abcam 88078
4	Transportador de glucosa 2 (GLUT2)	57		Abcam 54460

7.15 Aislamiento y expresión del RNA de GLUT-2 y receptor de glucagón.

Para la extracción del ácido ribonucleico (RNA) total se utilizó la metodología descrita por QIAGEN. Después de los tratamientos indicados en el diseño experimental se obtuvieron 100 mg de tejido hepático, se cubrió inmediatamente con RNAlater y se mantuvo durante 24 h a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a -70 °C.

Para el aislamiento del RNA, se pesaron 50 mg del tejido hepático y se homogeneizaron con 1 ml del reactivo de Lisis QIAzol, con un homogenizador, por 20-40 seg. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente (15-25 °C) por 5 min. Este paso promueve la disociación de los complejos de las nucleoproteínas. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó por 15 seg y se dejó a temperatura ambiente por 2-3 min. Se centrifugó a 12.00 x g por 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación, la muestra se separó en 3 fases: una fase acuosa transparente (superior) que contenía el RNA, una interfase blanca y una fase orgánica de color rojo (inferior). A la fase acuosa se le adicionó 600 µl de etanol al 70% y se mezcló en vortex. Se tomaron 700 µl de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que pudiera formarse y se pasó por una

minicolumna (de aislamiento de RNA total) para filtrar; se centrifugó a 8,000 x g por 15 seg a temperatura ambiente (15-25 °C), se repitió el paso anterior usando el resto de la muestra. Para lavar la columna se adicionó 700 µl de Buffer RW1, se centrifugó por 15 seg a 8,000 x g. La columna se lavó dos veces con Buffer RPE, después de cada lavado, se centrifugó a 8,000 x g por 15 seg a temperatura ambiente. Para secar la membrana del gel de silicona, se centrifugó a 11,000 x g, por 2 minutos y el filtrado se desechó. El RNA se recuperó en un tubo nuevo, se agregaron dos veces 30-50 µl de agua libre de RNasa sobre la membrana del gel de silicona; para filtrar se centrifugó cada vez por 1 min en las condiciones ya indicadas. El RNA se dividió en alícuotas que se almacenaron a -70°C.

La transcripción en reversa acoplado a reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se llevó a cabo para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa ImProm II a partir de 2 µg de RNA total de las células; también se utilizaron iniciadores al azar (random primers 0.5 µg/µL). Un volumen total de 20 µL 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 plus SYBR Green 1 para cada uno de los genes a estudiar: Glut-2 Gene Bank NM 011400.3 (L-GCCTGTGTATGCAACCATTG y R-GAAGATGGCAGTCATGCTCA); receptor de glucagón Gene Bank NM

008101.2 (L-AATGCCACCACAACCTAAGC y R-GCCCACACCTCTTGAACACT).

Se utilizó la proteína ribosomal 36B4 (TCACCAATCGTGAAGCTCGA y CCAAAAAGAGGCTAATGCCATG) como gen de normalización. El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo Rotor Gene. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 µL conteniendo 0.5 mM de oligonucleótidos de los genes descritos previamente y la mezcla de reacción 1X que contenía la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y cloruro de magnesio (MgCl₂) 3.5 mM.

7.16 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó el programa NCSS y el nivel de significancia fue del 95%. Cada experimento *in vivo* se realizó por triplicado en tres eventos independientes.

8. Resultados

8.1 Rendimiento y caracterización del extracto de *C. ficifolia*

Se preparó el extracto acuoso de *C. ficifolia*, obteniendo un rendimiento del 5% por kg. El perfil cromatográfico del extracto de *C. ficifolia* se determinó usando la metodología previamente descrita por HPLC y la detección de su absorción con una longitud de onda (λ) de 262 nm. En el análisis fitoquímico realizado al extracto no se logró detectar la presencia de DQI y para corroborar la ausencia de DQI en el extracto se determinó el límite de detección (LoD del inglés Limit of detection) y el límite de cuantificación (Limit of quantification) de

este compuesto, resultando en LoD = 0.05 mg/ml y LoQ = 0.1 mg/ml), relación señal-ruido. El extracto de *C. ficifolia* tampoco contuvo ácido gálico, catequina, nicotinamida y rutina.

El perfil químico del extracto íntegro de *C. ficifolia* a una concentración de 3 mg/ml (Fig. 1A) resultó en dos picos mayoritarios a 3.35 y 8.49 min. Por lo tanto, se decidió extraer 100 mg de extracto seco en 5 ml de metanol para incrementar la concentración de los metabolitos secundarios (Fig. 1B). Además, se realizó un proceso de bipartición del extracto activo (10 g), que fue disuelto en 200 ml de agua grado HPLC y extraído con 200 ml de acetato de etilo. Con esto fue posible incrementar considerablemente la concentración de los metabolitos secundarios (Fig. 1C).

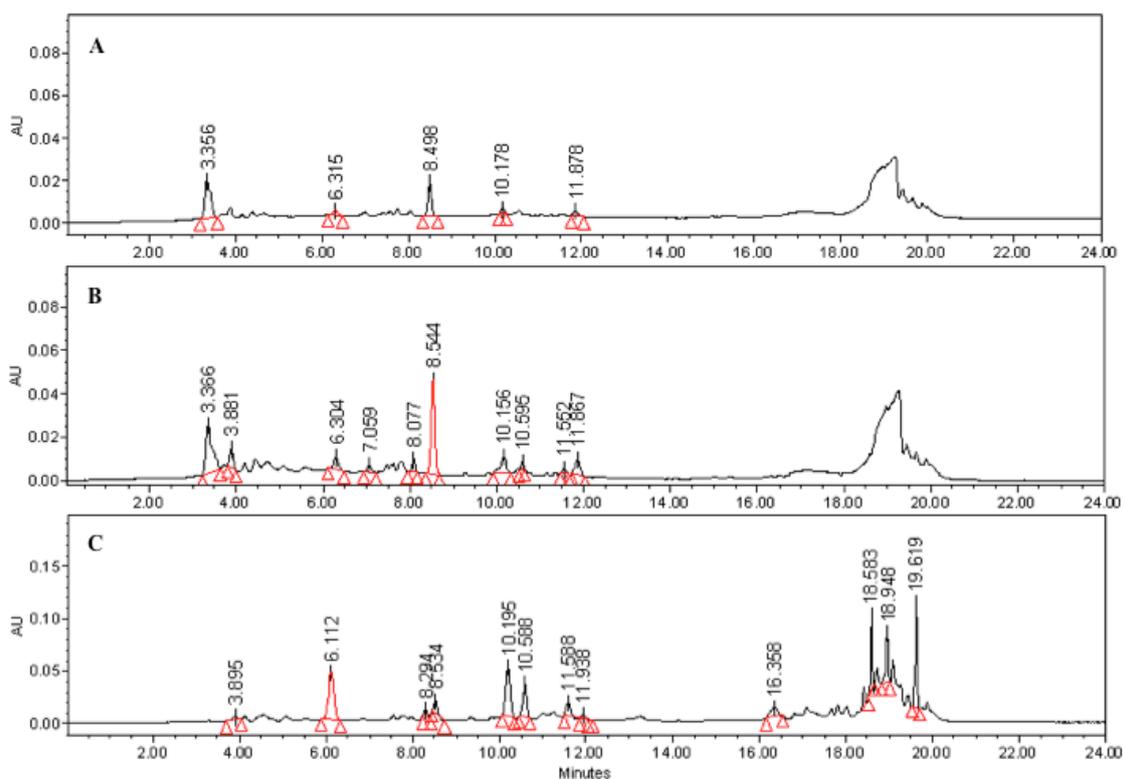


Figura 1. Cromatograma de HPLC del extracto acuoso de *C. ficifolia* (A); del extracto metanólico (B) y de la fracción con acetato de etilo de *C. ficifolia* ($\lambda=264$ nm).

Tomando este resultado en consideración, se decidió realizar una extracción del fruto seco con metanol para poder aislar los compuestos menos polares presentes en el extracto activo. Para llevar a cabo este aislamiento químico, se tomaron 800 g de fruto seco y se sometieron a maceración (72 h) con 3000 mL de metanol. Se separó la fase líquida cada 24 h para concentrarla por destilación a presión reducida (Rotavapor Heidolph Lavorota 4000) hasta sequedad. Este proceso generó 70 g de extracto metanólico (rendimiento 8.75%).

En la Figura 2 se muestra la comparación del extracto activo con el extracto metanólico, en la que se pudo confirmar que este extracto menos polar (Fig. 2B) también extrae los compuestos representativos del extracto activo (Fig 2A).

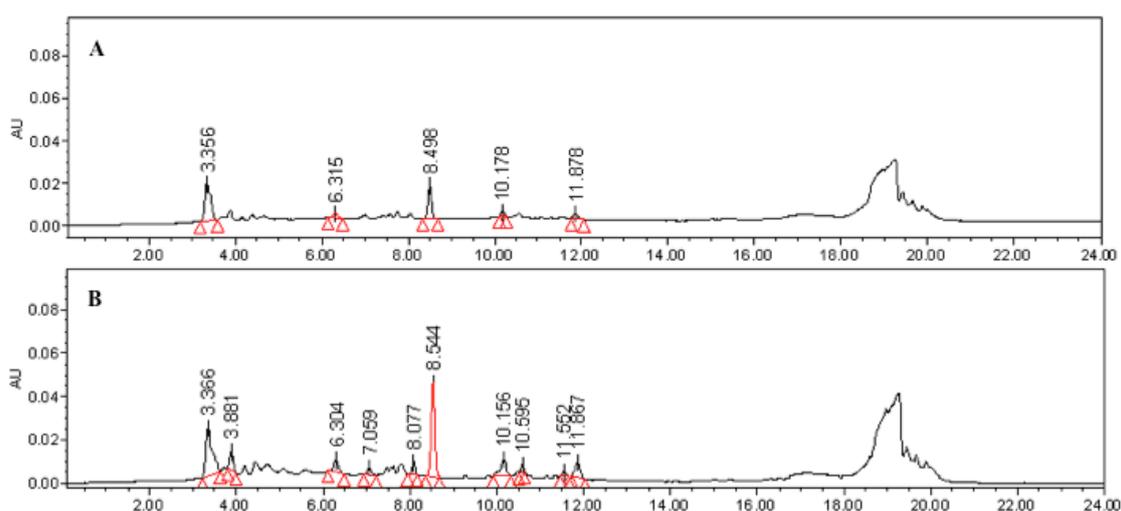


Figura 2. Cromatograma de HPLC del extracto acuoso activo de *C. ficifolia* (A) y del extracto metanólico (B) ($\lambda=264$ nm).

Con la intención de extraer selectivamente los compuestos químicos en orden de polaridad, el extracto metanólico fue sometido a percolación con mezcla de disolventes de polaridad ascendente. Se pesaron 70 g de extracto,

se absorbieron en 70 g de sílica gel (fase normal, Merck) y se depositaron en una columna de vidrio abierta. La fase móvil consistió en una mezcla de *n*-hexano: isopropanol en el siguiente orden y proporción: 80:20, 50:50. Se realizaron colectas de 500 ml y se concentraron en el rota evaporador. Cada una de las 3 fracciones obtenidas se nombraron como CfC1F1, CfC1F2 y CfC1F3, respectivamente (Figura 3).

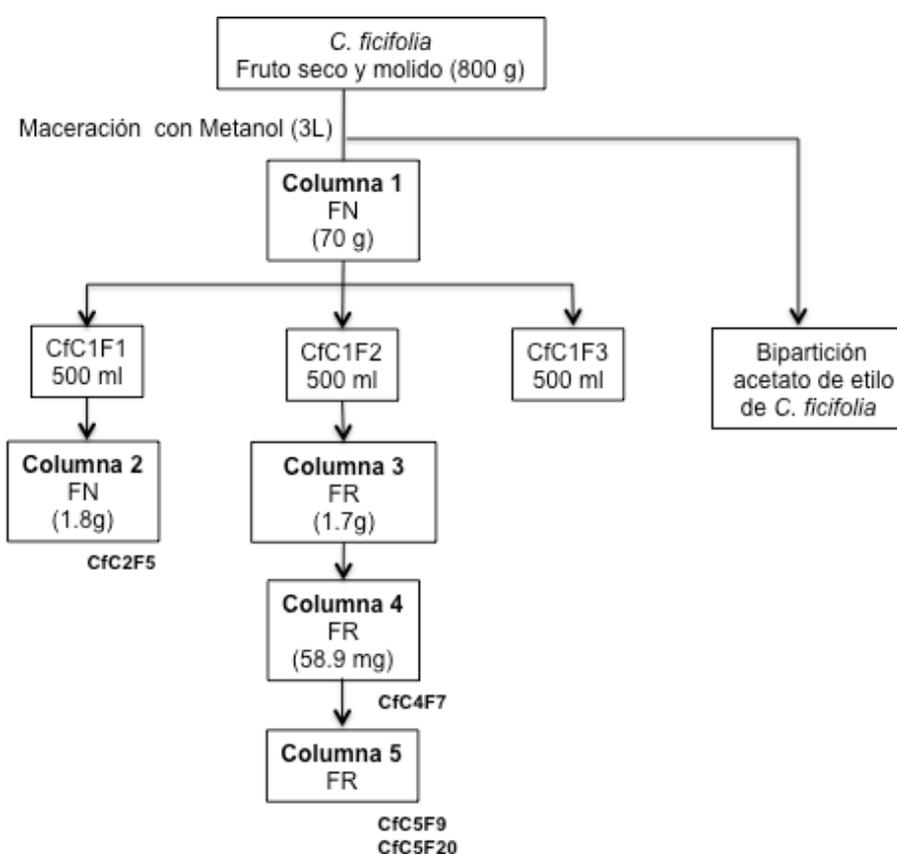


Figura 3. Proceso de separación del extracto de *C. ficifolia* con diferentes disolventes.

La fracción CfC1F1 se analizó y purificó mediante CCA, fue empacada con 10 g de sílica gel 60 (fase normal, Merck) y se activó con *n*-hexano. La fase móvil consistió en una mezcla de gradientes *n*-hexano:acetato de etilo en el siguiente orden y proporción: 100:0, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50 y metanol 100%. Se realizaron colectas de 15 ml y se concentraron en el rota

evaporador, obteniéndose 34 fracciones obtenidas, las cuales fueron comparadas por CCF y según la similitud de los compuestos fueron reagrupadas como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Fraccionamiento de la cromatografía en columna de C2			
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave
<i>n</i> -hexano 100%	1-5	1-5	CfC2F1
<i>n</i> -hexano: acetato de etilo 90:10	6-8	6-7	CfC2F2 CfC2F3 CfC4F4
<i>n</i> -hexano: acetato de etilo 85:15	9-15	10-14 15-27	CfC2F5 CfC2F6
<i>n</i> -hexano: acetato de etilo 80:20	16-22		
<i>n</i> -hexano: acetato de etilo 70:30	23-27		
<i>n</i> -hexano: acetato de etilo 50:50	28-33	28-29 31-32	CfC2F7 CfC2F8 CfC2F9
Metanol 100%	34		CfC2F10 CfC2F11

La fracción CfC2F5 fue analizada por un método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, observándose dos compuestos mayoritarios a 35.4 (pico 1) y 36.6 min (pico 2), respectivamente en relación con la Figura 4. El análisis de masas del pico 1 indicó que este compuesto corresponde con el estigmasten-7,22-dien-3-ol, mientras que el del pico 2 corresponde al estigmasten-7-en-3-ol. Estas estructuras fueron corroboradas mediante la comparación de los datos de RMN ¹³C (Tabla 3).

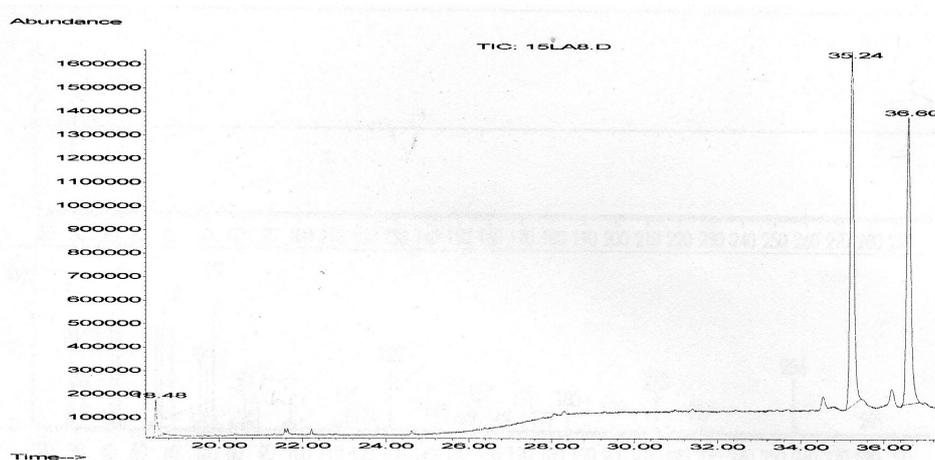


Figura 4. Cromatograma de la fracción CfC2F5. El pico en 35.24 min corresponde al estigmasten-7,22-dien-3-ol, el pico en 36.6 min corresponde con el estigmasten-7-en-3-ol.

Tabla 3. Datos de los espectros de ^{13}C de RMN (ppm) del compuesto **estigmasten-7,22-dien-3-ol** y **estigmasten-7-en-ol** de la fracción CfC2F5.

Carbon position	CfC2F5 estigmasten-7,22-dien-3-ol	^{13}C Nusrat <i>et al.</i> , 1995.	C2F5 estigmasten-7-en-ol	^{13}C Seo <i>et al.</i> , 1987.
1	37.91	37.0	37.11	37.16
2	31.41	27.6	31.85	31.47
3	71.06	74.0	71.06	71.05
4	37.91	33.9	37.91	37.97
5	40.24	40.4	40.24	40.27
6	29.68	29.4	29.68	29.67
7	117.43	117.2	117.43	117.43
8	139.45	139.6	139.45	139.59
9	49.43	49.0	49.43	49.47
10	34.2	34.4	34.2	34.21
11	21.53	---	21.53	21.57
12	39.54	39.6	39.45	39.58
13	43.37	41.3	43.26	43.38
14	55.02	55.6	51.23	55.05
15	23.05	23.1	22.95	22.99
16	28.49	28.4	27.95	27.97
17	55.88	55.8	56.07	56.08
18	12.23	12.0	11.82	11.85
19	13.02	12.5	13.02	13.04
20	40.8	40.2	36.57	36.73
21	21.07	21.0	18.97	18.98
22	138.14	138.0	33.87	33.88
23	129.42	129.6	26.18	26.52
24	51.23	51.3	45.82	46.07
25	31.85	31.8	29.14	28.97
26	19.02	19.2	18.97	18.98
27	21.53	---	19.81	19.61
28	25.38	25.5	23.05	23.01
29	12.03	12.6	12.23	12.33

En la figura 5 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C , donde se lograron identificar los desplazamientos químicos correspondientes a estigmasten-7,22-dien-3-ol y estigmasten-7-en-3-ol.

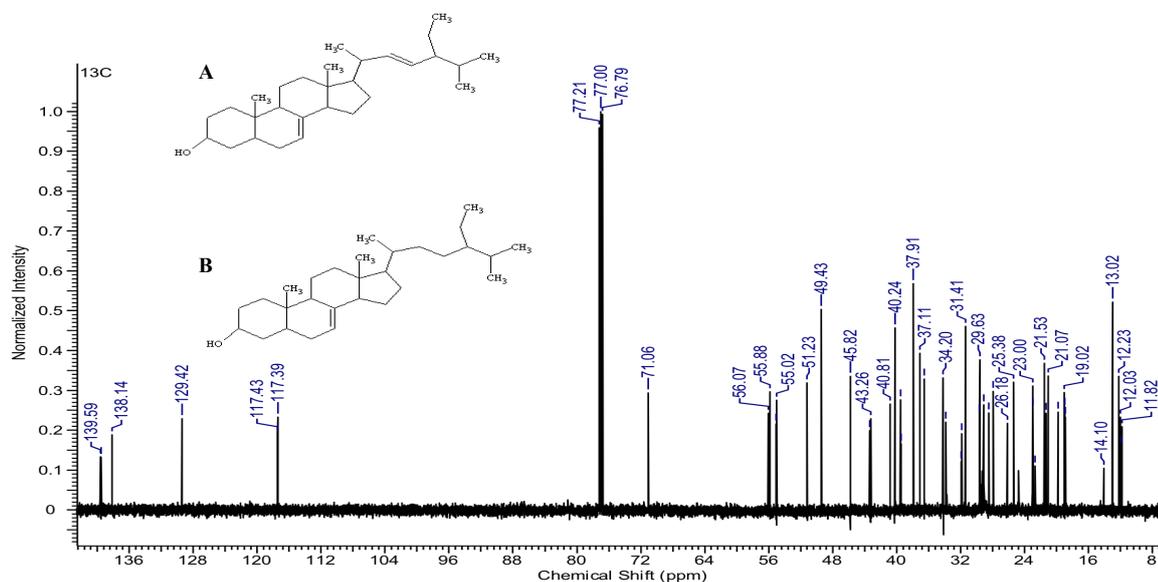


Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de CfC2F5 que corresponde a la mezcla de estigmasten-7,22-dien-3-ol (A) y estigmasten-7-en-3-ol (B).

Por otro lado, se pesaron 1.7g de la fracción seca CfC1F2 (Columna 3) que fueron adsorbidos en 2 g de sílica gel de fase reversa y sometidos a un proceso de cromatografía en columna abierta empacada con sílica gel RP-C18. La fase móvil consistió de un sistema de gradientes agua y acetonitrilo en el siguiente orden y proporción: agua HPLC:acetonitrilo; 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 30:70 y 0:100. Se realizaron colectas de 15 ml y se concentraron en el rotaevaporador; cada una de las 72 fracciones obtenidas fueron comparadas por CCF y según la similitud de los compuestos se reagruparon en 49 fracciones (Tabla 4).

Tabla 4. Fraccionamiento de la cromatografía en columna de C3			
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave
Agua HPLC 100%	1-4	2-4	CfC3F1 CfC3F2
Agua: Acetonitrilo 95:5	5-12	6-7 9-12	CfC3F3 CfC3F4 CfC3F5 CfC3F6
Agua: Acetonitrilo 90:10	13-34	15-16 19-20 21-23 31-38	CfC3F7 CfC3F8 CfC3F9 CfC3F10 CfC3F11 CfC3F12 CfC3F13 CfC3F14 CfC3F15 CfC3F16 CfC3F17 CfC3F18 CfC3F19 CfC3F20 CfC3F21
Agua: Acetonitrilo 80:20	35-41	39-43	CfC3F22
Agua: Acetonitrilo 70:30	42-44	44-45	CfC3F23
Agua: Acetonitrilo 60:40	45-48	47-48	CfC3F24 CfC3F25
Agua: Acetonitrilo 50:50	49-53		CfC3F26 CfC3F27 CfC3F28 CfC3F29 CfC3F30
Agua: Acetonitrilo 30:70	54-58		CfC3F31 CfC3F32 CfC3F33 CfC3F34 CfC3F35
Acetonitrilo 100%	59-72		CfC3F36-49

Debido a que las fracciones CfC3F9-CfC3F12 (CfC3F6, Fig. 6) presentaron un perfil químico similar, se decidió agruparlas para llevar a cabo su separación química por cromatografía en columna.

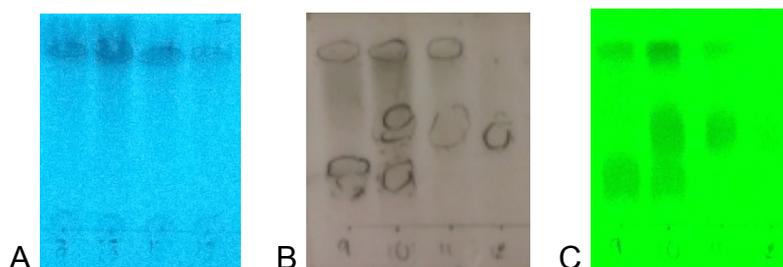


Figura 6. Cromatoplasmas de sílica gel 60 de las fracciones CfC3F9,10,11 y 12. **A.** Fase reversa de las fracciones. Fase móvil 8:2, agua: acetonitrilo. Con luz UV. **B.** Fase Normal. Fase móvil 5:5:2:500 μ L *n*-hexano: isopronanol: metanol: ácido trifluoroacético. Revelador 4-hidroxibenzaldehido. **C.** Fase Normal. Fase móvil 5:5:2:500 μ L *n*-hexano: isopronanol: metanol: ácido trifluoroacético. Luz UV.

También se analizó la fracción CfC3F6 (Columna 4) con peso de 58.9 mg ya que la CCF indicó la presencia de un compuesto mayoritario. Esta fracción se purificó mediante un proceso de cromatografía en columna abierta. La columna fue empacada con 1 g de sílica gel POLYGOPREP® 60-50 C₁₈ (fase reversa, MACHEREY-NAGEL) como fase estacionaria y la fase móvil consistió en una mezcla de agua y acetonitrilo en el siguiente orden y proporción: agua 100%, agua/acetonitrilo 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50 y acetonitrilo 100%. De esta manera obtuvimos 22 fracciones y se analizaron los factores de retención obtenidos en la CCF y se agruparon. La metodología de purificación se muestra en Tabla 5.

Tabla 5. Fraccionamiento de la cromatografía en columna de C4			
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave
Agua HPLC 100%	1-3		CfC4F1 CfC4F2
Agua: Acetonitrilo 95:5	3-6	5-6	CfC4F3 CfC4F4 CfC4F5
Agua: Acetonitrilo 90:10	7-12	8-9	CfC4F6 CfC4F7 CfC4F8 CfC4F9 CfC4F10
Agua: Acetonitrilo	13-14		CfC4F11

80:20		14-18	CfC4F12
Agua: Acetonitrilo 70:30	15-19		CfC4F13
Agua: Acetonitrilo 50:50	20-21		CfC4F14 CfC4F15
Acetonitrilo 100%	22		CfC4F26

Con los resultados de los factores de retención obtenidos en la CCF se agrupó la fracción 8 y 9 (CfC4F7), que contenían compuestos químicos de polaridad semejante. Se analizó el cromatograma de CfC4F7 mediante HPLC, el cual muestra uno de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto activo, con un tiempo de retención de 8.54 min (Fig. 7).

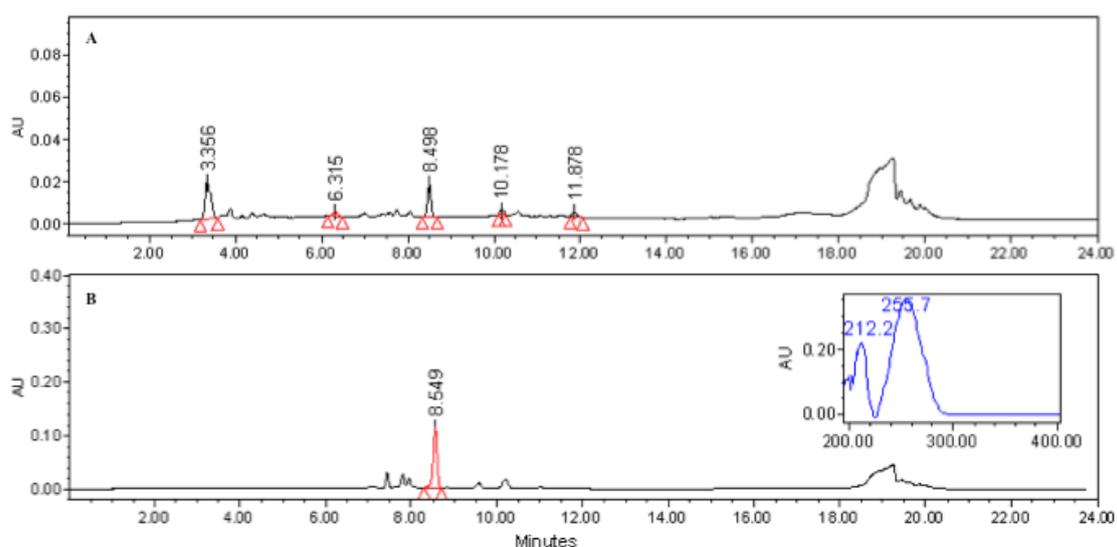


Figura 7. Cromatograma de HPLC del extracto de *C. ficifolia* ($\lambda=262$ nm) (A). Fracción CfC4F7 y su espectro de absorción ultravioleta ($\lambda=258$ nm) (B).

Esta fracción fue analizada por RMN de ^1H y, de acuerdo con los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento obtenidas, se pudo determinar que el compuesto mayoritario presenta desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento similares a la salicina (Tabla 6).

Tabla 6. ^1H RMN datos de los espectros (ppm) del compuesto contenido en la fracción CfC4F7 correspondiente a salicina y datos reportados.		
^1H RMN	^1H CfC4F7	^1H Sub <i>et al</i> , 2015
1	---	---

2	---	---
3	7.41 (brd, 6.94)	7.32 (dd, 7.7, 1.4)
4	7.28 (brd, 6.94)	7.01 (td, 7.7, 0.7)
5	7.04 (d 8.4)	7.19 (td, 7.7, 1.4)
6	7.36 (d, 8.4)	7.12 (brd, 7.7)
7a	4.66 (d, 11.56)	4.78 (d, 12.6)
7b	4.93 (d, 11.56)	4.57 (d, 12.6)
1	4.35 (d, 7.7)	4.83 (d, 7.7)
2'	3.34 (dd, 7.71, 8.4)	3.51 (dd, 8.4, 7.7)
3'	3.35 (t, 8.4)	3.46 (t, 8.4)
4'	3.31 (overlap)	3.39 (overlap)
5'	3.25 (m)	3.65 (ddd, 9.8, 6.3, 2.1)
6a	3.69 (dd, 5.4, 11.56)	4.49 (dd, 11.9, 2.1)
6'b	3.89 (dd 2.31, 11.5)	4.32 (dd, 11.9, 6.3)

En el análisis del espectro de RMN ^1H se observaron señales de los principales grupos funcionales de salicina (Fig. 8).

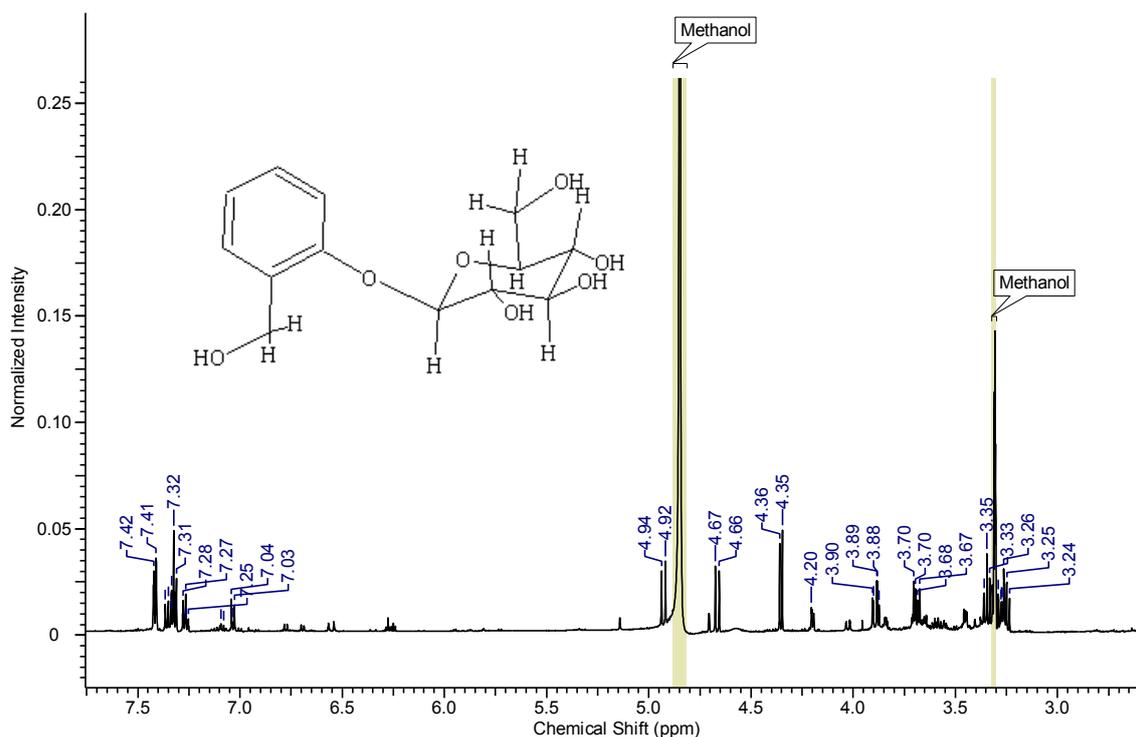


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de CfC4F7 en que se logró identificar los dos principales grupos funcionales presentes en la molécula de salicina.

Por otro lado las fracciones CfC4F14-CfC4F18 (CfC4F12) fueron agrupadas en función de su parecido químico (Fig. 9) y sometidas a un subsecuente proceso de cromatografía en columna abierta para su purificación.



Figura 9. Cromatoplaqa de sílica gel 60. Fase reversa. Fase móvil 8:2, agua: acetonitrilo. Revelador 4-hidroxibenzaldehido. Fracciones 14, 15, 16, 17 y 18, que corresponde CfC4F12.

La fracción CfC4F12 (Columna 5) fue empacada en una columna con 1 g de sílica gel POLYGOPREP® 60-50 C₁₈ (fase reversa, MACHEREY-NAGEL) como fase estacionaria y la fase móvil consistió en una mezcla de agua HPLC: acetonitrilo en el siguiente orden y proporción: 100:0, 98:2, 95:5, 93:7, 90:10, 88:12, 85:15, 83:17, 80:20, 78:22, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 y 0:100. Se realizaron colectas de 15 ml y se concentraron en el rotaevaporador. De cada una de las 61 fracciones obtenidas se analizaron los factores de retención obtenidos en la CCF. La metodología de purificación se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Fraccionamiento de la cromatografía en columna de C5			
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave
Agua HPLC 100%	1-3		CfC5F1 CfC5F2 CfC5F3
Agua: Acetonitrilo 98:2	4-7		CfC5F4 CfC5F5 CfC5F6 CfC5F7
Agua: Acetonitrilo 95:5	8-11		CfC5F8 CfC5F9 CfC5F10 CfC5F11
Agua: Acetonitrilo 93:7	12-15		CfC5F12 CfC5F13 CfC5F14 CfC5F15
Agua: Acetonitrilo 90:10	16-19		CfC5F16 CfC5F17 CfC5F18 CfC5F19

Agua: Acetonitrilo 88:12	20-23		CfC5F20 CfC5F21 CfC5F22 CfC5F23
Agua: Acetonitrilo 85:15	24-27		CfC5F24 CfC5F25 CfC5F26 CfC5F27
Agua: Acetonitrilo 83:17	28-31		CfC5F28 CfC5F29 CfC5F30 CfC5F31
Agua: Acetonitrilo 80:20	32-35		CfC5F32 CfC5F33 CfC5F34 CfC5F35
Agua: Acetonitrilo 78:22	36-39		CfC5F36 CfC5F37 CfC5F38 CfC5F39
Agua: Acetonitrilo 75:25	40-43		CfC5F40 CfC5F41 CfC5F42
Agua: Acetonitrilo 70:30	44-47		CfC5F44 CfC5F45 CfC5F46 CfC5F47
Agua: Acetonitrilo 60:40	48-51		CfC5F48 CfC5F49 CfC5F50 CfC5F51
Agua: Acetonitrilo 50:50	52-55		CfC5F52 CfC5F53 CfC5F54 CfC5F55
Agua: Acetonitrilo 40:60	56-59		CfC5F56 CfC5F57 CfC5F58 CfC5F59
Acetonitrilo 100%	60		CfC5F60
Metanol 100%	61		CfC5F61

Se analizó el cromatograma de CfC5F9 mediante HPLC, el cual muestra uno de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto, con un tiempo de retención de 10.035 min (Fig. 10).

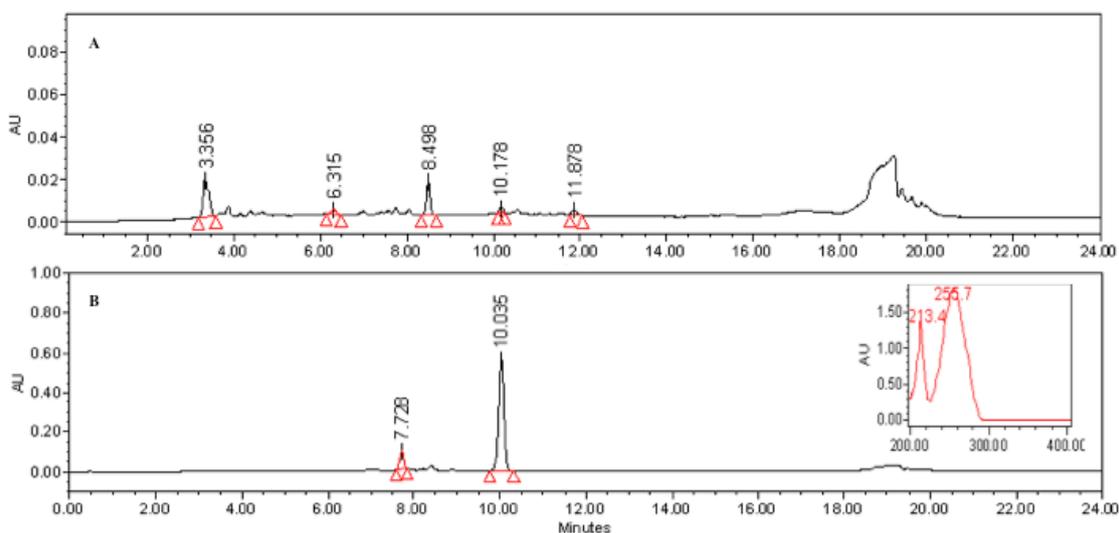


Figura 10. Cromatograma de HPLC **A.** Extracto de *C. ficifolia* ($\lambda=262$ nm). **B.** Fracción CfC5F9 y su espectro de absorción ($\lambda=254$ nm).

Esta fracción fue analizada por RMN de ^1H y, de acuerdo con los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento obtenidas, se pudo determinar que el compuesto mayoritario presenta desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento similares al ácido *p*-hidroxibenzoico (Tabla 8).

Tabla 8. ^{13}C e ^1H RMN datos de los espectros (ppm) del compuesto contenido en la fracción CfC5F9 correspondiente a ácido *p*-hidroxibenzoico y datos reportados.

$^{13}\text{C} / ^1\text{H}$ RMN	CfC5F9		Pianaro <i>et al.</i> , 2007.	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	170.18	---	170.07	---
2	122.83	---	122.73	---
3	132.97	7.87	132.99	7.86
4	116.00	6.82	116.03	6.80
5	163.27	---	163.36	---
6	116.00	6.83	116.03	6.80
7	132.97	7.88	132.73	7.86

En el análisis del espectro de RMN ^1H (Fig. 11) se observaron señales de los principales grupos funcionales de los compuestos *p*-hidroxibenzoico (A), *o*-hidroxifenilacético (B) y ácido *p*-hidroxifenilacético (C).

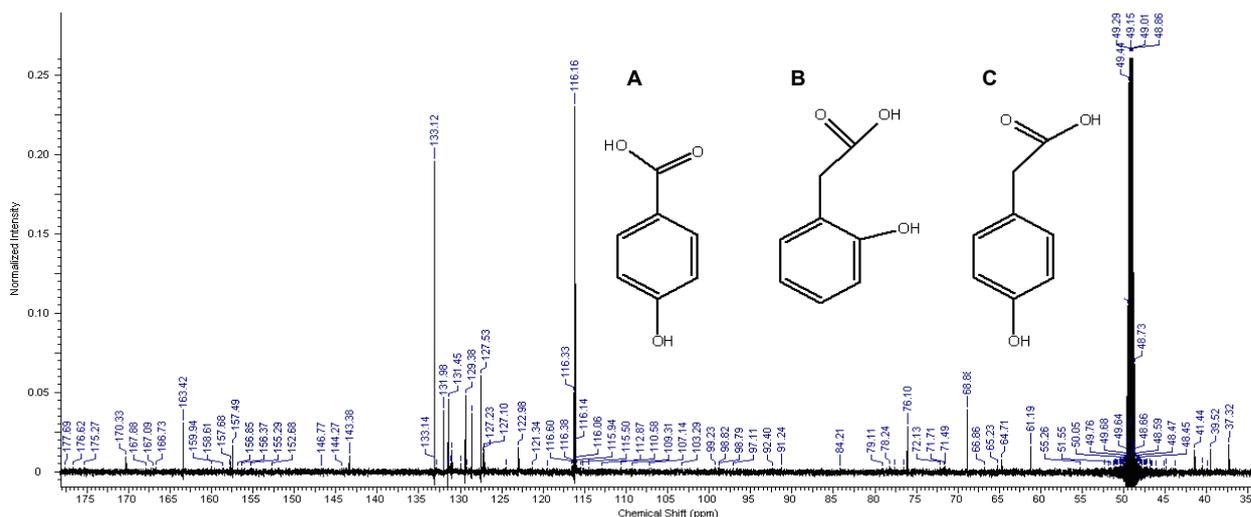


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, MeOH) de ácido *p*-hidroxibenzoico (A), *o*-hidroxifenilacético (B) y ácido *p*-hidroxifenilacético (C) encontradas en CfC5F9 donde se lograron identificar los principales grupos funcionales presentes en cada molécula.

Esta fracción fue analizada por RMN de ^1H y de acuerdo a los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento obtenidas con datos reportados, también se pudo determinar la presencia de otros compuestos mayoritarios, como: ácido *o*-hidroxifenilacético y ácido *p*-hidroxifenilacético (Tabla 9).

Tabla 9. ^{13}C e ^1H RMN datos de los espectros (ppm) de los compuestos contenidos en la fracción CfC5F9 correspondiente a ácido <i>o</i> -hidroxifenilacético y ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético con datos reportados.								
^{13}C RMN	ácido <i>o</i> -hidroxifenilacético				ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético			
	CfC5F9		Bal <i>et al.</i> , 2008		CfC5F9		Ohtani <i>et al.</i> , 2011	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	121.34	---	124.20	---	126.94	---	126.53	---
2	152.68	6.71	156.85	6.99	127.37	7.10	131.16	7.2
3	116.60	6.71	118.18	---	115.50	6.73	115.91	6.78
4	129.22		134.23	---	158.61	---	157.10	---
5	121.19	6.70	123.36	6.91	115.50	6.73	115.91	6.78
6	127.08	6.71	131.80	7.20	127.37	7.10	131.16	7.2
7	36.50	---	38.41	---	41.44	---	40.42	---
8	177.54	---	179.68	7.29	176.46	---	173.17	---

Mientras que en el análisis cromatográfico por HPLC de CfC5F20 permitió establecer que esta fracción presenta el mismo tiempo de retención (15.98 min) y espectro de ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 227-228, 310 \text{ nm}$) que el ácido *p*-coumárico (muestra comercial; Sigma-Aldrich) (Fig. 12).

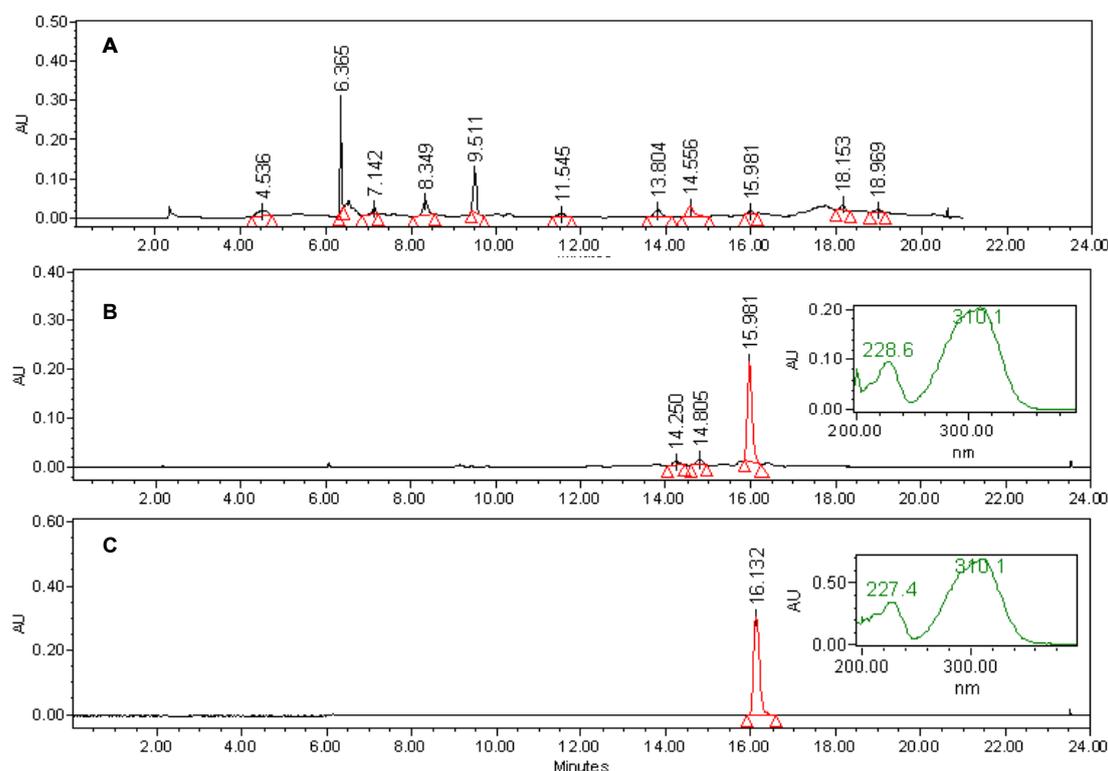


Figura 12. Cromatograma de HPLC y su espectro de absorción ultravioleta (detección a los 310 nm). **A.** Cromatograma del extracto de *C. ficifolia*. **B.** Cromatograma de la fracción CfC5F20. **C.** Cromatograma del estándar de ácido *p*-coumárico, con un tiempo de retención de 16.13 min.

8.2 Efecto de *C. ficifolia* sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa

En el estudio agudo en ratones normales la glucemia basal fue similar entre los grupos. El extracto acuoso de *C. ficifolia* causó reducciones significativas en la glucemia ($p < 0.05$) a los 240 y 360 min (Fig. 13). Glibenclamida provocó reducciones significativas de la glucemia a los 120, 240 y 360 min.

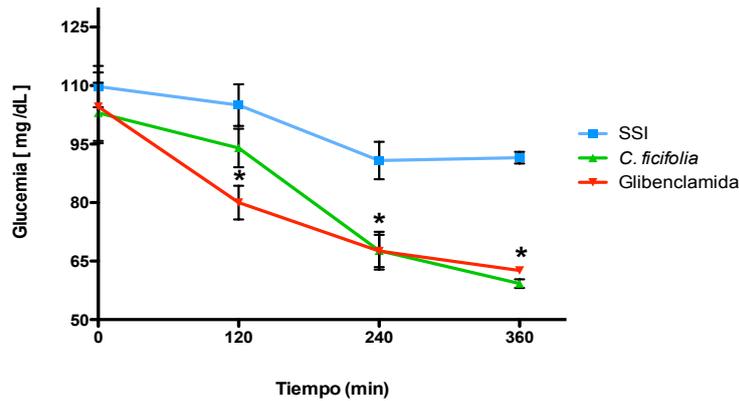


Figura 13. Glucemias después de la administración de *C. ficifolia*, SSI y glibenclámdida. Media \pm S.E.M. (n=10). *Diferencia significativa respecto al valor inicial ($p < 0.05$).

En el grupo de animales diabéticos inducidos con aloxana, hubo reducciones significativas en la glucemia ($p < 0.05$) a los 360 min, tanto con *C. ficifolia* como con glibenclámdida (Fig. 14).

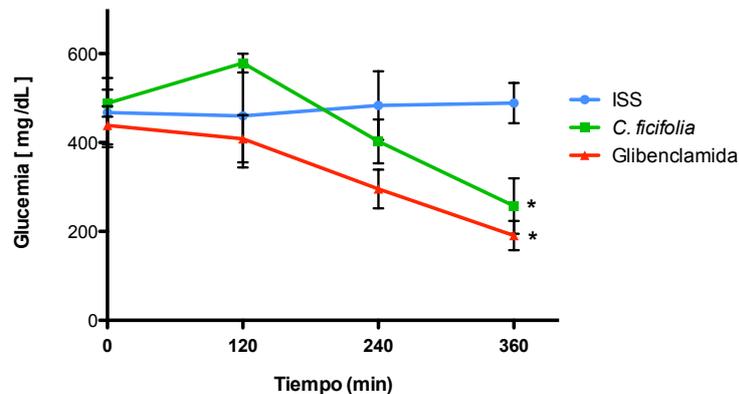


Figura 14. Glucemias después de la administración de *C. ficifolia*, SSI y glibenclámdida en ratones diabéticos inducidos con aloxana. Media \pm S.E.M. (n=10). *Diferencia significativa respecto al valor inicial ($p < 0.05$).

En el estudio subcrónico los valores de glucemia fueron significativamente mayores en los ratones diabéticos inducidos con aloxana sin tratamiento que en los ratones control normoglucémicos. *C. ficifolia* disminuyó los niveles de glucosa en un 25% con respecto al grupo control con aloxana ($p < 0.05$) (Fig. 15). Por el contrario, la metformina mostró una disminución no significativa en los niveles de glucosa.

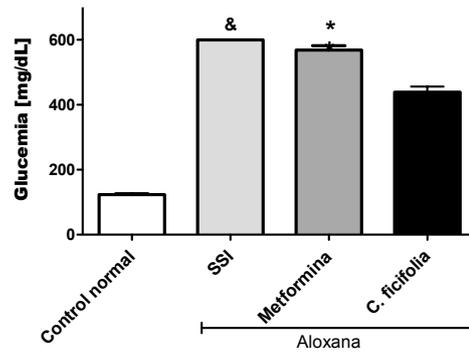


Figura 15. Glucemia a los 30 días del tratamiento con SSI (control normal), *C. ficifolia* y metformina en ratones diabéticos inducidos con aloxana con ayuno de 12 h (Media \pm S.E.M., n=10). *Diferencia significativa respecto al grupo diabético control, & Diferencia significativa con el control normal (p<0.05).

8.3 Efecto de la administración diaria de *C. ficifolia* sobre parámetros bioquímicos

No se observó ningún cambio significativo (p<0,05) en los niveles plasmáticos de colesterol ni triglicéridos a los 30 días de la administración diaria con los diferentes tratamientos a los (Fig. 16).

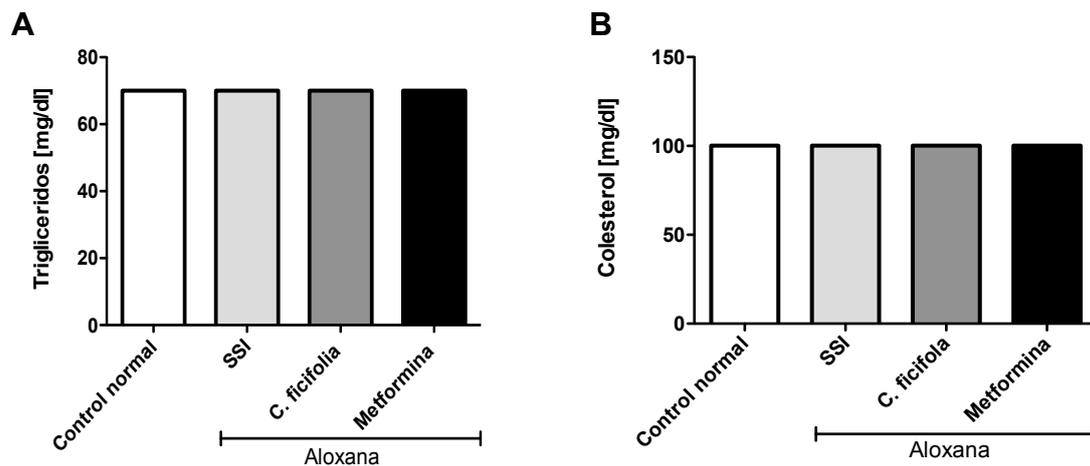


Figura 16. Niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol en los ratones con los tratamientos a los 30 días. Media \pm S.E.M. (n=5) *Diferencia significativa respecto al grupo diabético control (p<0.05).

Se observó un aumento significativo (p <0,05) en los niveles séricos de GPT y GOT en el grupo diabético control en comparación con los ratones

control normal (Fig. 17A y 17B). *C. ficifolia* causó una disminución significativa en la GPT y GOT ($p < 0,05$), mientras que la metformina provocó una disminución significativa en sólo los niveles de GOT ($p < 0,05$).

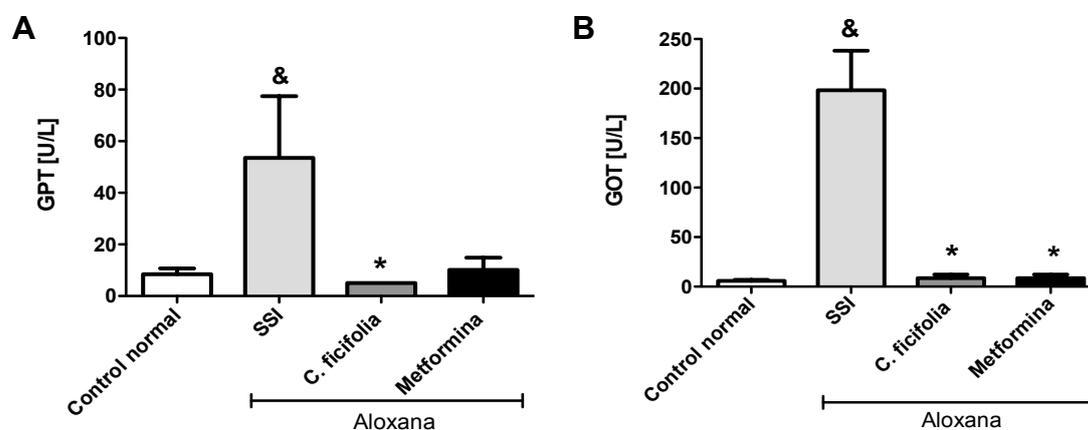


Figura 17. Niveles plasmáticos de GPT (A) y GOT (B) en ratones diabéticos inducidos con aloxana con los diferentes tratamientos por 30 días. Media \pm S.E.M. (n=5). & Diferencia significativa respecto al control normal ($p < 0,05$). *Diferencia significativa respecto al grupo diabético control ($p < 0,05$).

8.4 Efecto de *C. ficifolia* en el almacenamiento de glucógeno en el hígado

Podemos identificar cualitativamente el contenido de glucógeno, que se muestra en rosa, mediante la tinción de PAS de la sección transversal de hígado (Fig. 18A-D), en el que la distribución y la acumulación de hidratos de carbono, y principalmente de glucógeno, es evidente. En el grupo tratado con *C. ficifolia* incrementó la acumulación de glucógeno y se distribuyó de forma heterogénea en todo el parénquima del hígado (Fig. 18C). La metformina mostró un resultado similar (Fig. 18D). El grupo con aloxana mostró menos glucógeno distribuido a través del parénquima (Fig. 18B).

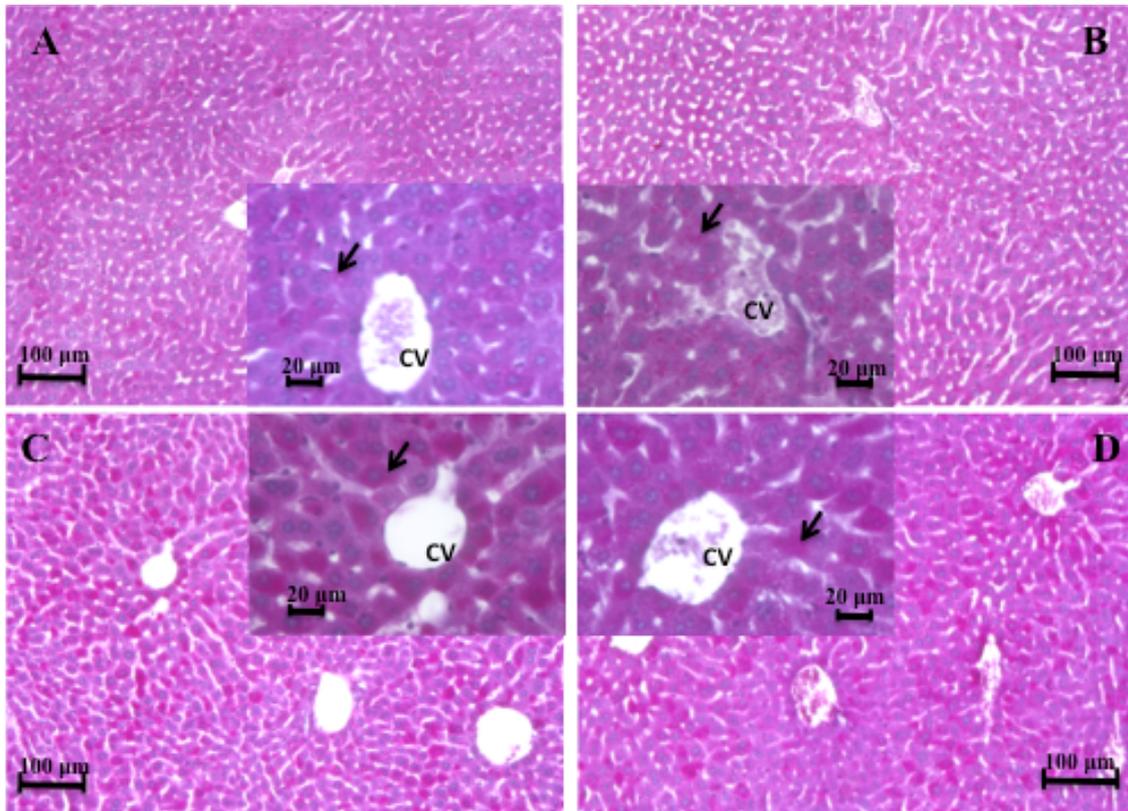


Figura 18. Las microfotografías de secciones transversales del hígado de la administración subcrónica, con tinción PAS en rosa. **A.** Hígado de ratones normoglucémicos control. **B.** Hígado de ratones diabéticos control inducidos con aloxana. **C.** Hígado de ratones diabéticos tratados con *C. ficifolia*. **D.** Hígado de ratones diabéticos tratados con metformina. CV: Vena central; flechas indican las áreas positivas a PAS. 100 aumento original y recuadro 400x.

C. ficifolia cuantitativamente incrementó el contenido de glucógeno de hígado en un 195% con respecto al grupo control con aloxana ($p < 0.05$) (Fig. 19). La metformina también aumentó el contenido de glucógeno de hígado de 158% con respecto al grupo control con aloxana ($p < 0.05$) (Fig. 19).

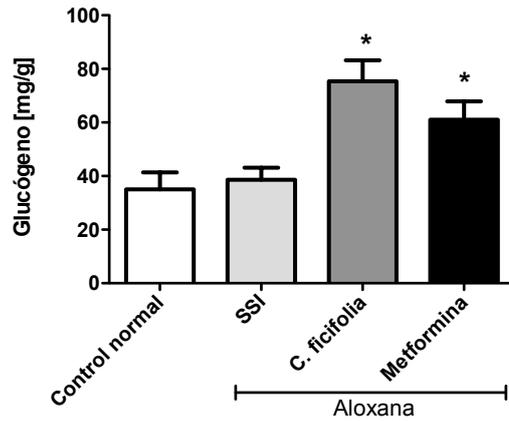


Figura 19. Niveles del contenido de glucógeno hepático en los ratones diabéticos tratados durante 30 días. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 5). *Diferencia significativa con el grupo diabético control, $p < 0.05$.

El área PAS positiva se observó incrementada en el grupo tratado con *C. ficifolia* en comparación con el grupo diabético tratado con SSI ($p < 0.05$) (Fig. 20).

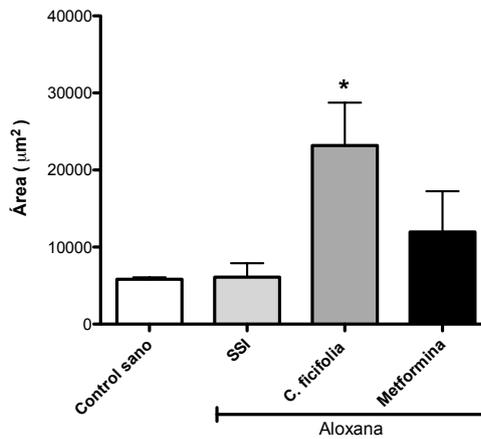


Figura 20. Áreas positivas a PAS (μm^2) en cortes histológicos de hígado. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 5). * Diferencia significativa el diabético control, $p < 0.05$.

8.5 Influencia de *C. ficifolia* sobre los niveles de insulina

El tratamiento con *C. ficifolia* tiende a incrementar los niveles de insulina, sin embargo no es significativo, al igual que con metformina ($p < 0.05$) (Fig. 21).

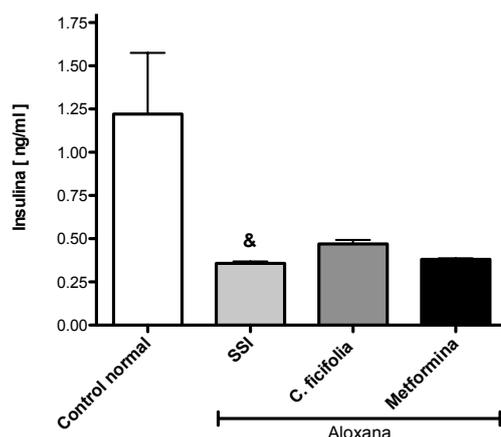


Figura 21. Niveles séricos de insulina en los ratones diabéticos tratados durante 30 días. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 5). & Diferencia significativa en comparación con el control, $p < 0.05$.

8.6 Influencia de *C. ficifolia* sobre la glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa en el hígado

El tratamiento con *C. ficifolia* mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de enzimas glucógeno sintasa en comparación con el grupo control con aloxana (Fig. 22). La metformina no modificó los niveles de esta enzima.

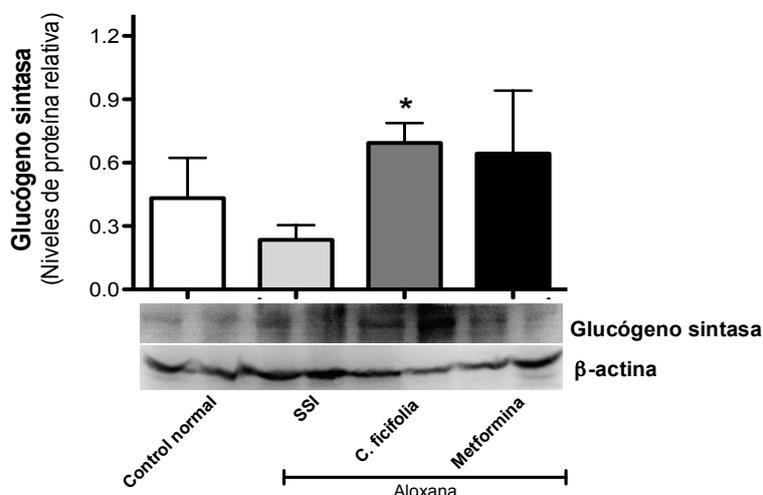


Figura 22. Niveles de proteína relativa de glucógeno sintasa en los ratones diabéticos tratados durante 30 días. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M., normalizados con β -actina (N = 5). * Diferencia significativa en comparación con grupo diabético control, $p < 0.05$.

Por el contrario, *C. ficifolia* y metformina mostraron una disminución significativa de la glucógeno fosforilasa en comparación con el diabético control (Fig. 23).

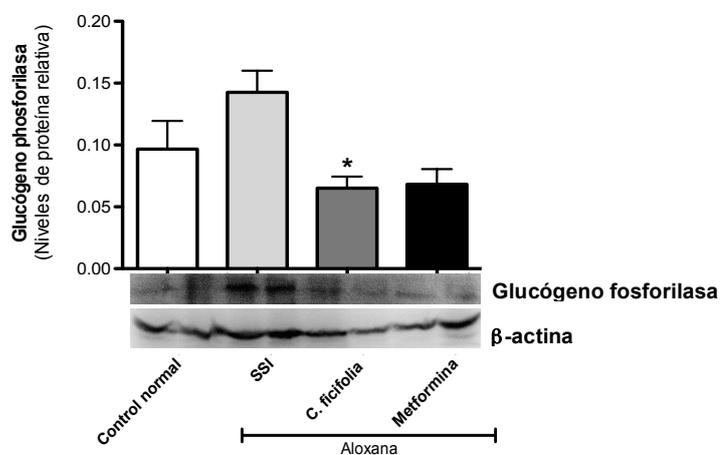


Figura 23. Niveles de proteína relativa de glucógeno fosforilasa en los ratones diabéticos tratados durante 30 días. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M., normalizados con β -actina (N = 5). * Diferencia significativa en comparación con grupo diabético control, $p < 0.05$.

8.7 Efecto de *C. ficifolia* sobre la histología en hígado.

Se puede observar en las fotomicrografías histológicas de los hígados de ratones con diferentes tratamientos que el citoplasma de hepatocitos tiene depósitos de glucógeno denso alrededor de la vena central (Fig. 24C-F). Los hepatocitos se visualizaron con núcleos eucromáticos y nucléolos. Los lóbulos del hígado se pueden observar (recuadro), al igual que la vena central, los cordones de hepatocitos y algunas células de Kupffer situadas en el espacio sinusoidal, así como algunas células endoteliales que recubren el centro de la vena. El grupo control normal tratado con ISS (Fig. 24C) y el grupo tratado con *C. ficifolia* (Fig. 24E) después de 30 días de tratamiento no mostraron cambios en la histología hepática, conservando la estructura general del lóbulo hepático. El hígado de ratones diabéticos inducidos con aloxana (Fig. 24D) mostraron un desarreglo de los lóbulos hepáticos, daño celular y degeneración en globo, que

se confirmó por la presencia de vesiculación típica, degeneración hidrópica, cariorrexis, cariólisis y regiones citoplásmicas alteradas, así como una mayor acidofilia citoplasmática, congestión vascular, un estado de hiperemia, y degeneración hidrópica. El grupo de metformina mostró la infiltración de leucocitos, principalmente por los neutrófilos, que es característica de una condición inflamatoria (Fig. 24F).

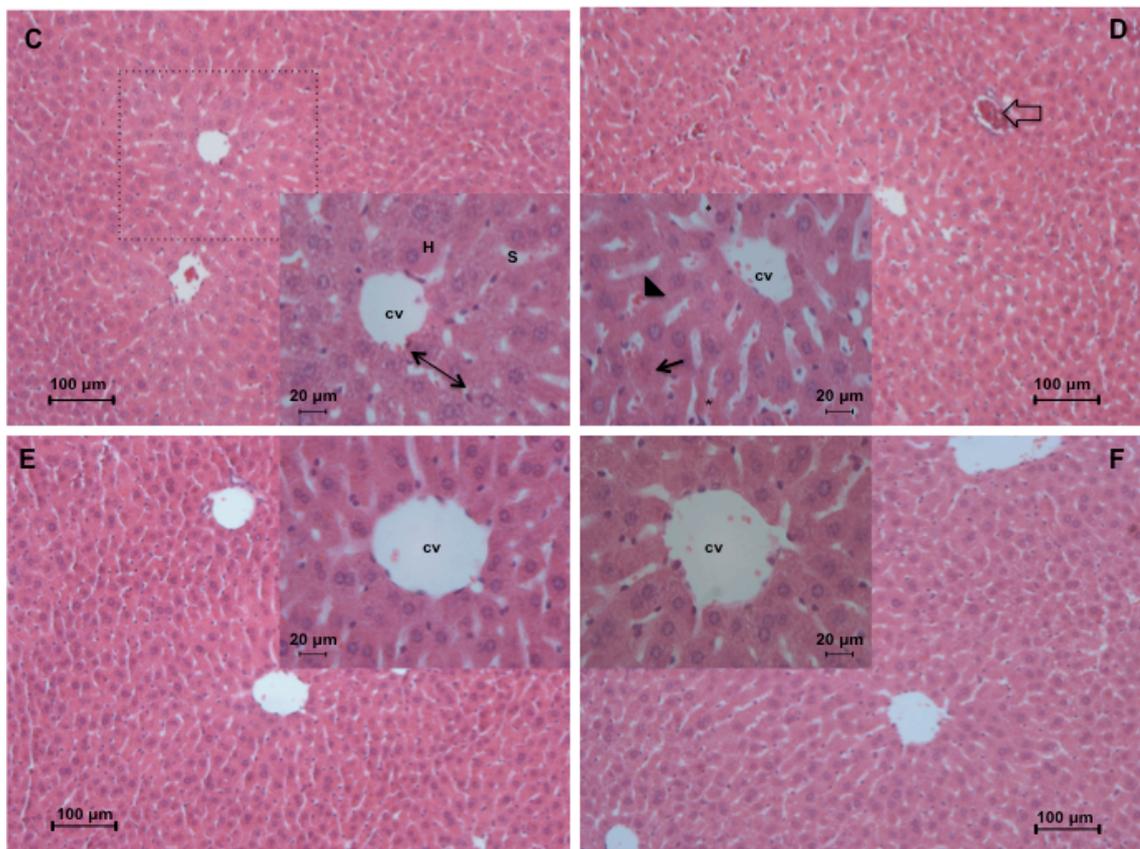


Figura 24. Fotomicrografías de cortes transversales de hígado de ratón por la administración diaria por 30 días, teñidos con H-E, aumento original principal 100x y recuadro 400x. **A.** Control; **B.** Diabético con aloxana; **C.** *C. ficifolia*; **D.** Glibenclamida por 30 días. H: hepatocitos; CV: vena central; S: sinusoides; flecha reversible: cordón hepático; línea discontinua: lobulillo hepático; flecha sin relleno: congestión vascular; flecha: cariorrexis; cabeza de flecha: congestión vascular; asterisco: degeneración hidrópica.

8.8 Efecto del extracto de *C. ficifolia* sobre GLUT-2 *in vivo* e *in vitro*.

Los niveles de ARNm de GLUT-2 *in vivo* mostraron aumentos no significativos con *C. ficifolia*, mientras que con metformina el aumento si fue significativo en los niveles de expresión de este transportador de glucosa (Fig. 25).

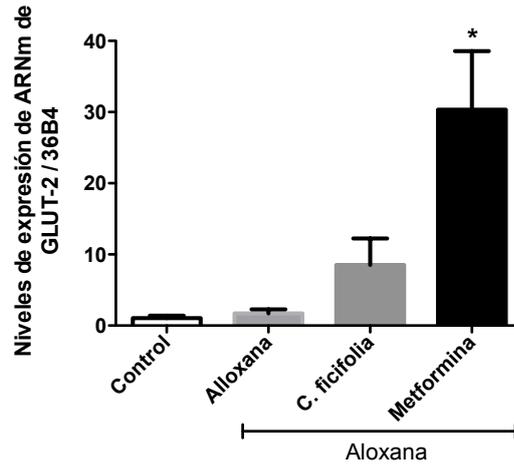


Figura 25. Niveles de expresión de GLUT2 en los ratones diabéticos tratados durante 30 días, se usó 36B4 como gen de normalización. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 5). * Diferencia significativa en comparación con grupo diabético control, $p < 0.05$.

El extracto de *C. ficifolia* tampoco modificó los niveles de proteína relativa determinada por Western blot de GLUT-2 *in vivo* después de 30 días de tratamiento en los ratones diabéticos, ni tampoco metformina (Fig. 26).

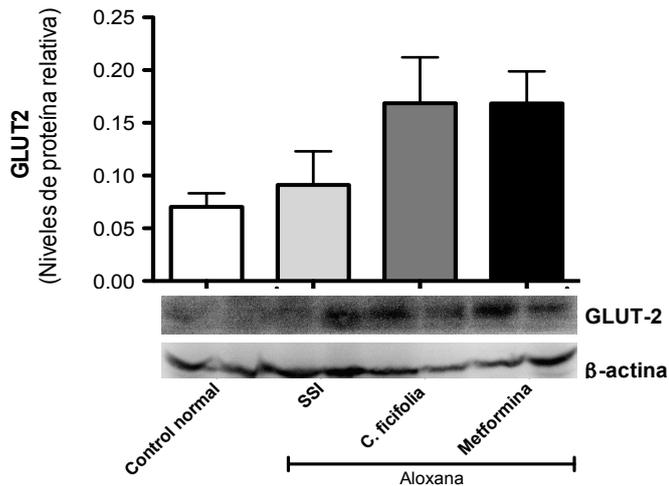


Figura 26. Niveles de proteína relativa de GLUT2 en los ratones diabéticos tratados durante 30 días, se usó β -actina como proteína de normalización. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 5). *Diferencia significativa en comparación con grupo diabético control, $p < 0.05$.

Mientras que *in vitro* *C. ficifolia* incrementó los niveles de ARNm de GLUT-2 con tratamiento por 12 horas comparado con los hepatocitos

control; metformina incremento los niveles de GLUT-2 tanto a 12 como 24 horas, respecto al control (Fig. 27).

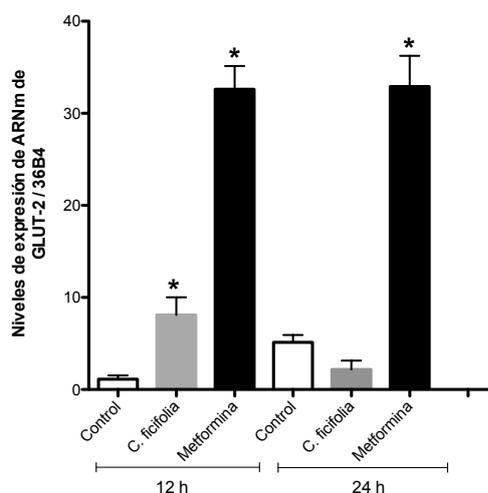


Figura 27. Niveles de expresión de ARNm de GLUT2 en los hepatocitos tratados durante 12 y 24 horas, se usó 36B4 como gen de normalización. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 3). * Diferencia significativa en comparación con las células control, $p < 0.05$.

8.9 Efecto del extracto de *C. ficifolia* sobre la expresión del receptor de glucagón *in vivo* e *in vitro*.

El extracto de *C. ficifolia* no modificó los niveles de expresión del receptor de glucagón *in vivo*. Metformina aumentó los niveles de expresión del receptor de glucagón en estos ratones diabéticos (Fig. 28).

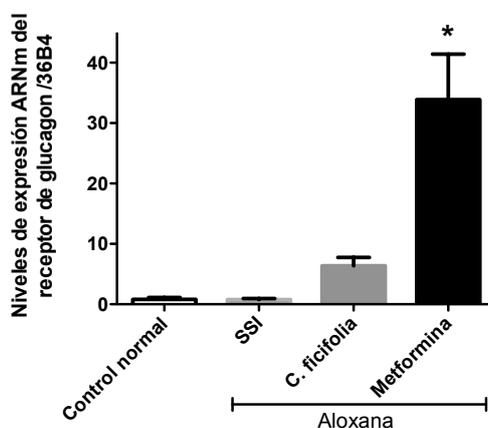


Figura 28. Niveles de expresión del receptor de glucagón en los ratones diabéticos tratados durante 30 días, se usó 36B4 como gen de normalización. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 5). * Diferencia significativa en comparación con grupo diabético con aloxana, $p < 0.05$.

Mientras que metformina *in vitro* nuevamente aumenta los niveles de expresión del ARNm del receptor de glucagón en los hepatocitos tratados por 12 y 24 horas (Fig. 29).

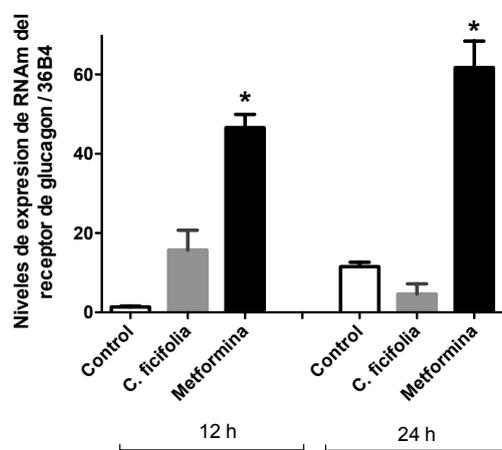


Figura 29. Niveles de expresión de ARNm del receptor de glucagón en los hepatocitos tratados durante 12 y 24 horas, se usó 36B4 como gen de normalización. Los valores se expresan como la media \pm S.E.M. (N = 3). * Diferencia significativa en comparación con las células control, $p < 0.05$.

8.10 Efecto de *C. ficifolia* sobre la histología pancreática.

En las fotomicrografías podemos observar que la estructura general de este órgano consta de la zona exocrina constituida por células acinares (AC) pancreáticas de tipo epitelial, la zona endocrina o islotes de Langerhans (IL) constituidos por diversos tipos celulares como: células alfa, beta, delta y las productoras del polipéptido pancreático (Fig. 30A). Los islotes de Langerhans en el grupo control normal se encontraban igualmente dispersos en el tejido pancreático y a menudo abundantemente distribuidos en la zona exocrina y de diversos tamaños incrustadas dentro de las células acinares y rodeadas por una fina cápsula (Fig. 30A). Los islotes pancreáticos de los ratones diabéticos control revelaron una reducción significativa en el tamaño y el número de las células acinares alrededor de los islotes, también se observó cariorrexis y degeneración hidrópica en algunas células acinares, así como congestión

vascular (Fig.30B). Mientras que con *C.ficifolia* no se encontraron daños aparentes en la zona exocrina al igual que con metformina, sin embargo el tamaño de los islotes de Langerhans se observó disminuido en los tres grupos diabéticos inducidos con aloxana.

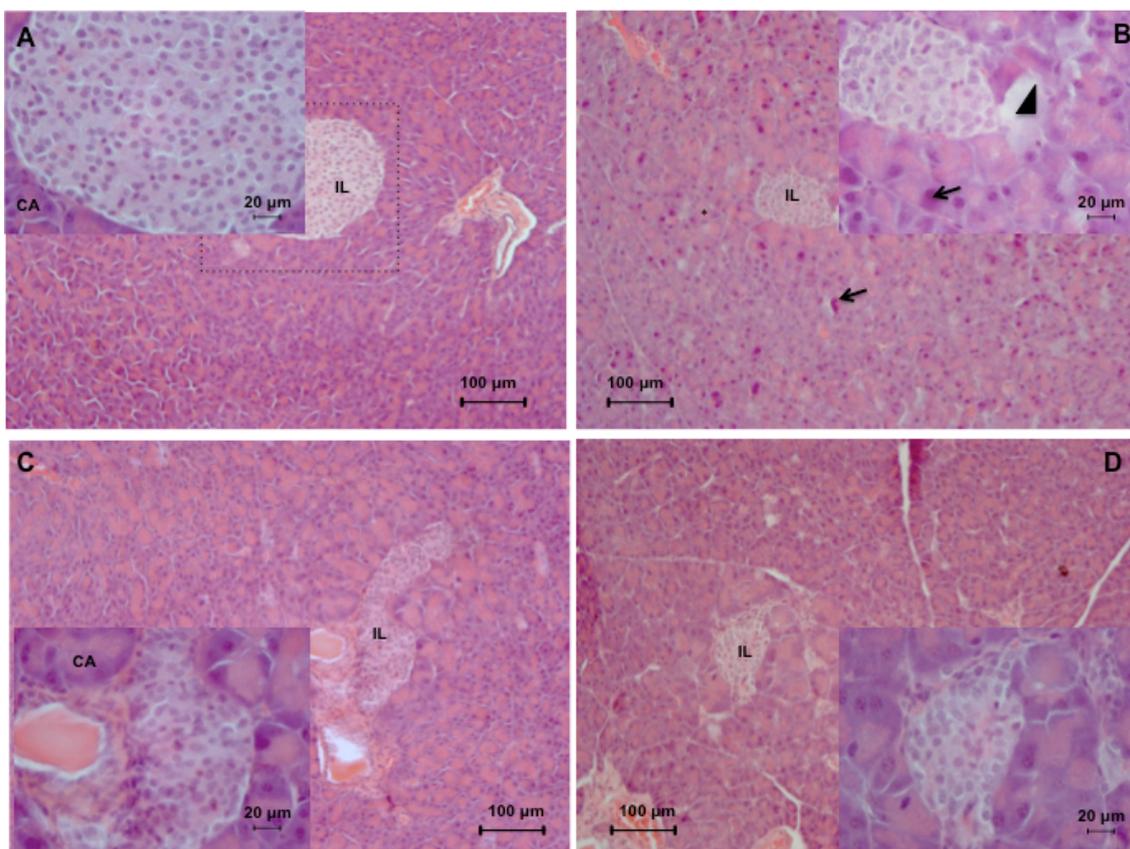


Figura 30. Fotomicrografías de cortes transversales de páncreas de ratón por la administración diaria por 30 días, teñidos con H-E, aumento original principal 100x y recuadro 400x. **A.** Control normal; **B.** Diabético control; **C.** Diabético con *C. ficifolia*; **D.** Diabético con glibenclamida. IL: islotes de Langerhans; CA: célula acinar; línea discontinua: islote de Langerhans; flecha: cariorrexis; cabeza de flecha: degeneración hidrópica.

9. Discusión

El fruto de *C. ficifolia* se ha reportado con efecto hipoglucémico en diferentes modelos experimentales, incluyendo ratas, ratones y conejos con diabetes experimental moderada y severa, y en pacientes con diabetes tipo 2 (Alarcón *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2001). En estos estudios se ha establecido que una dosis intragástrica de 200 mg/kg de *C. ficifolia* es suficiente para

observar el efecto hipoglucémico. Los resultados de la presente investigación mostraron un efecto hipoglucémico en un estudio agudo y subcrónico bajo las mismas dosis de extracto acuoso de *C. ficifolia*, aún sin la presencia de DQI en el extracto.

El estudio químico de este extracto permitió la identificación de siete compuestos mayoritarios: dos fitosteroles; estigmasten-7,22-dien-3-ol y estigmasten-7-en-3-ol, así como ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *o*-hidroxifenilacético y ácido *p*-hidroxifenilacético y salicina. De acuerdo con la literatura, el efecto hipoglucémico se podría atribuir a el ácido *p*-hidroxibenzoico, ya que es uno de los principales componentes en el extracto y se ha reportado con efecto hipoglucémico en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (Manuja *et al.*, 2013). Sin embargo, esto debe ser confirmado en estudios posteriores y con los datos del presente trabajo no es posible descartar a los otros componentes presentes en el extracto, ya que podrían estar mediando este efecto teniendo diferentes blancos involucrados en la regulación del metabolismo de carbohidratos.

Xia y Wang (2006b) sugirieron que el efecto hipoglucémico de *C. ficifolia* implica un aumento en los niveles de insulina y además observaron un aumento de glucógeno hepático. Los resultados del presente trabajo indican que el efecto hipoglucémico con *C. ficifolia* puede ser debido a un aumento en el almacenamiento de glucógeno hepático (confirmado con una tinción de PAS), como consecuencia del aumento de la enzima glucógeno sintasa. Otras especies de cucurbitáceas también se han evaluado y reportan efectos similares, como *Cucurbita moschata*, que también aumenta los niveles de

glucógeno muscular y mejora el rendimiento físico en ratones (Wang *et al.*, 2012).

La respuesta del hígado normal a una carga de glucosa implica, la liberación de insulina, la inactivación secuencial de la glucógeno fosforilasa y la activación de la glucógeno sintasa, que es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de glucógeno. Por el contrario, en el modelo de diabetes inducida con aloxana, la respuesta del hígado a la glucosa se vuelve deficiente unos pocos días después de la administración de aloxana, con la activación deteriorada de la glucógeno sintasa (Ou *et al.*, 2012; Browne *et al.*, 2001).

Interesantemente, en este estudio la administración del extracto de *C. ficifolia* aumentó los niveles de glucógeno sintasa y, por consiguiente, el glucógeno del hígado de ratones diabéticos, esto se asocia con la disminución de la glucógeno fosforilasa. Los niveles altos de insulina promueven el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en el hígado a través de la desfosforilación y activación de la glucógeno sintasa a través de la vía de PKB, una vez que esta se une a su receptor (Wilcox, 2005; MacAulay y Woodgett, 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se observó aumento de los niveles de insulina, debido probablemente a que las muestras de suero fueron tomadas a los 120 min después de la administración de *C. ficifolia* en ratones, mientras que el incremento de insulina ocurre a los 90 min después de la administración del extracto en un estudio agudo (García, 2011), sin embargo no se descarta la posibilidad de que haya aún secreción de insulina, ya que en el análisis histológico pancreático se observó la presencia de islotes de Langerhans sin daños aparentes. Se tienen reportes de que triterpenos y flavonoides inhiben a la glucógeno fosforilasa, lo cual podría estar relacionado

con nuestros hallazgos, así como la presencia de estos compuestos en el extracto reportados previamente (Stravodimos *et al.*, 2016; Banderas *et al.*, 2012).

Por otro lado la insulina actúa como un regulador de la secreción negativa de glucagón, y a su vez activa a la glucógeno fosforilasa (fosforilasa a) (Browne *et al.*, 2001; Im *et al.*, 2005; Marty *et al.*, 2005). En este estudio se observaron bajos niveles de receptor de glucagón en ratones tratados con *C. ficifolia* y de la glucógeno fosforilasa, tanto *in vivo* como *in vitro* lo que conduce a una inhibición de la glucógenolisis y como resultado una disminución de glucosa en plasma.

Por otra parte, la disponibilidad de glucosa libre aumenta GLUT-2 (Im *et al.*, 2005). Sin embargo, debido al efecto hipoglucemiante de *C. ficifolia* y a la falta de glucosa libre disponible para ser capturado en hepatocitos, la expresión de GLUT2 se encontró disminuida *in vivo*, mientras que en cultivo primario de hepatocitos los niveles de este transportador se vieron incrementados. Esto puede ser atribuido a que *C. ficifolia* disminuye enzimas de la gluconeogénesis en el hígado, tales como glucosa 6 fosfatasa, reportado por Banderas en 2012. En este caso, el hígado no libera la glucosa, pues no hay necesidad de este transportador, contribuyendo así a la disminución de los niveles de glucosa hepática (Banderas 2012).

Así, este estudio proporciona evidencia clara de que el mecanismo de acción de *C. ficifolia* implica el almacenamiento de glucógeno hepático. Se tienen reportes que el ácido *p*-cumárico inhibe la gluconeogénesis en el hígado mediante la inhibición de transporte de piruvato en la mitocondria, como

informó Lima y col. (2006), por lo que este compuesto podría estar participando en la disminución de GLUT2 en el hígado (Lima *et al.*, 2006).

La diabetes inducida por aloxana produce hepatotoxicidad y necrosis hepática (Sawants *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2003). Por ello, en este estudio fue importante determinar la funcionalidad de hígado de ratones diabéticos tratados con *C. ficifolia* a través de la cuantificación de los niveles de GPT y GOT del hígado en el suero. Los niveles elevados de GPT están relacionados con daño en el hígado y un desarreglo de la histología hepática en pacientes con DT2, mientras que los niveles elevados de GOT se encuentran relacionados con el desarrollo de fibrosis en las células sinusoidales hepáticas (Judi *et al.*, 2010).

En el presente estudio, ratones diabéticos inducidos con aloxana mostraron niveles elevados de ambas enzimas. Sin embargo en los ratones diabéticos administrados con el extracto acuso de *C ficifolia* disminuyeron significativamente los niveles tanto de GPT como de GOT, lo cual se infiere un efecto protector o reparador ante el daño inducido con aloxana. La histología hepática en ratones diabéticos control mostró desarreglo de hepatocitos, pérdida de la disposición radial de los lóbulos hepáticos, aumento del espacio sinusoidal y extensa degeneración, así como marcadores de necrosis como cariólisis y cariorrexis, que son características de una condición inflamatoria. Lo contrario se observó en el grupo tratado con extracto de *C. ficifolia*, que mostró una disposición radial normal de los lóbulos hepáticos y ausencia de necrosis. Mientras que en el tejido pancreático se observó una mejora en el grupo tratado con el extracto, lo cual demuestra un efecto protector del extracto.

Este efecto podría deberse a que el extracto de *C. ficifolia* contiene compuestos que ofrecen protección contra la toxicidad hepática, o podría ser debido a los efectos antioxidantes reportados previamente en esta especie, ya que mejora el estado redox modulando la relación GSH/GSSG en hígado, páncreas y riñones de ratones diabéticos. Sin descartar sus efectos sobre citocinas inflamatorias en adipocitos 3T3-L1 (Hernández *et al.*, 2002; Xia y Wang, 2006; Fortis *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2012).

Entre los compuestos antioxidantes reportados presentes en *C. ficifolia* son vitaminas, carotenoides y flavonoides, que actúan directa o indirectamente (inductores) como secuestradores de especies reactivas de oxígeno. Se ha reportado la presencia de cucurbitanos de tipo glucósidos, que ahora son reconocidos por su actividad citotóxica con potencial anticancerígena, lo cual puede ser útil en el tratamiento de diversas enfermedades, además de su efecto protector hepático (Banderas *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Así, los efectos farmacológicos reportados para *C. ficifolia*, tanto *in vitro* como *in vivo*, sustentan efectos antiinflamatorios, hepatoprotectores, antimicrobianos y antihiper glucémicos (Fortis *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2012; Hancock *et al.*, 2008; Azevedo y Rodriguez, 2007; Lee *et al.*, 2010; Banderas *et al.*, 2012).

Componentes fenólicos, tales como ácido *p*-hidroxibenzoico, han sido identificados como antioxidantes con capacidad de captación de radicales peroxilo, que contrarrestan los efectos perjudiciales de especies reactivas del oxígeno, causando efectos antiinflamatorios y antimicrobianos frente a una serie de microorganismos, también se tienen reportes de su actividad hipoglucemiante (Cho *et al.*, 1998; Manuja *et al.*, 2013; Peungvicha *et al.*,

1998). La actividad antioxidante reportada para el ácido *p*-cumárico podría ayudar a reducir el estrés oxidante y, en consecuencia, el daño celular a nivel hepático (Pereira *et al.*, 2009).

Otro de los compuestos mayoritarios del extracto de *C. ficifolia* es la salicina. Se tienen reportes que tiene actividad neuroprotectora y antiinflamatoria, lo que también podría contribuir al efecto protector hepático. De hecho, sus grupos hidroxilo pueden interactuar con la ciclooxigenasa-2, provocando la inhibición de esta enzima y provocando acción antiinflamatoria (Kim *et al.*, 2015; Mahdi, 2014).

En el presente trabajo se identificaron dos fitoesteroles en el extracto de acuoso de *C. ficifolia*: estigmasten-7,22-dien-3-ol y estigmasten-7-en-3-ol. Este tipo de compuestos se han reportado en las semillas de calabaza *Cucurbita pepo* L., que a menudo se come como un aperitivo y puede prevenir enfermedades crónicas. También se ha reportado para aliviar los síntomas de la hiperplasia benigna de próstata (Kim *et al.*, 2012; Abdel, 2006).

Cabe señalar que estos compuestos hipoglucemiantes pueden estar actuando solos o sinérgicamente a diferentes niveles y pueden revertir o reducir el daño debido a la DM. Por lo tanto, *C. ficifolia* representa una terapia prometedora para el tratamiento y el control de la DM, con efectos hipoglucémico, hepatoprotector, antioxidante y antiinflamatorio, con gran potencial para prevenir el desarrollo de las complicaciones vasculares características de la DM y mejorar la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad.

10. Conclusiones

El extracto acuoso de *C. ficifolia* corrige la hiperglucemia en ratones diabéticos inducidos con aloxana.

El extracto de *C. ficifolia* incrementó el almacenamiento de glucógeno hepático, relacionado con el aumento de glucógeno sintasa y disminución de glucógeno fosforilasa, enzimas implicadas tanto en la síntesis y degradación de glucógeno de ratones diabéticos inducidos con aloxana, sin cambios aparentes en la función y arquitectura hepática, ya que mantuvo los niveles de GPT y GOT similar a los niveles de ratones sanos, lo que podría interpretarse como un efecto protector de este órgano.

La caracterización química del extracto acuoso de *C. ficifolia* permitió la identificación de siete compuestos mayoritarios: dos fitoesteroles (estigmasten-7,22-dien-3-ol y estigmasten-7-en-3-ol), *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *o*-hidroxifenilacético y ácido *p*-hidroxifenilacético y salicina, los cuales se les ha reportado actividad farmacológica. Sin embargo en estudios posteriores se debe determinar si estos compuestos son el principio activo del extracto.

Por lo tanto el extracto estudiado representa una terapia alternativa para los pacientes con DM con complicaciones hepáticas, ya que corrige la hiperglucemia y posee efectos protectores para el hígado y páncreas, así como propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias.

Referencias

- Abdel R. 2006.** Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) diets on benign prostatic hyperplasia (BPH): chemical and morphometric evaluation in rats. *W J Chem* 1(1): 33-40.
- Acosta J, Jiménez E, Juárez M, Díaz J, 2001.** Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J Ethnopharmacol* 77: 99-101.
- Alarcón A, Hernández E, Campos A, Xolalpa S, Rivas J, Vazquez L, Román R, 2002.** Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol* 82: 185-189.
- Alberti K, Zimmet P, Shaw J. 2007.** International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. *Diabet Med* 24: 451-463.
- American Diabetes Association, 2016.** Standards of medical care in diabetes. *Diab Care* 39(1): S13-S22.
- Andrade C, Heinrich M, 2005.** Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99: 325-348.
- Aschner P, García R, 2009.** Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. OPS, 1-80.
- Arana C y Domingo M, 2001.** Fisiopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético. *Gac Med Méx* 139(3): 255-264.
- Azevedo M, Rodríguez A, 2007.** Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *J Agric Food Biochem* 55: 4027-4033.
- Bal D, Kraska D, Gradowska W, Gryff K, 2008.** Investigation of a wide spectrum of inherited metabolic disorders by ¹³C NMR spectroscopy, *A B Polonica* 55: 107-118.
- Banderas DTR, Roman RR, Zamilpa A, Garcia MR, Diaz M, Campos MG, Tortoriello J, Alarcon AFJ, 2012.** Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (*Cucurbita ficifolia* Bouché and *Ibervillea sonora* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings". *Boletín Latinoam. Caribe Plant Med Arom* 11(6): 510-519,
- Banderas D, 2012.** Actividad hipoglucemiante, antioxidante y antiinflamatoria de *Cucurbita ficifolia* Bouche, *Ibervillea sonora* Greene y *Psacalium peltatum* (H.BK.) Cass., plantas usadas para el control de la diabetes mellitus. Tesis de doctorado UAM Iztapalapa (UAMI), pp 1-96.

- Barquera S, Campos N, Aguilar S, López R, Arredondo A, Rivera D, 2013.** Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy. *Global Health* 9(3): 1-9.
- Borel J, Randoux A, Maquart F, Le P, Valeyre J, 1989.** Bioquímica Dinámica, Ed. Medica Panamericana, pp. 614-632.
- Browne G, Delibegovic M, Keppens S, Stalmans W, Cohen PTW, 2001.** The level of the glycogen targeting regulatory subunit R5 of protein phosphatase 1 is decreased in the livers of insulin-dependent diabetic rats and starved rats. *Biochem J* 360(2): 449-459.
- Campbell J, Drucker D, 2013.** Pharmacology, physiology and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Met* 17: 1-19.
- Castro R, Rodríguez M, 2006.** El endotelio: una encrucijada en las complicaciones vasculares de la diabetes en el anciano. *Angiología* 58: 1-9.
- Chang C, Chen C, Liao Y, Cheng H, Chen Y, Chou C, 2008.** Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *J Nat Prod* 71: 1327-1330.
- Chen J, Chiu M, Nie R, Cordel G, Qiu S, 2005.** Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep* 22: 386-399.
- Cho J, Moon J, Seong K, Park K, 1998.** Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and *trans* 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(11): 2273-2276.
- Díaz F, Angeles M, Baiza G, Medina N, Hernández S, Ortega C, Roman R, Cruz M, Alarcon A, 2012.** Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *J Ethnopharmacol* 144(1): 101-108.
- Díaz M, Vázquez M, Báez R, Martínez C, Soto A, Ávila C, Larriva S, 2010.** Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical morphometric, and ultrastructural study. *Comp Hepatol* 9(5): 1-10.
- Domínguez P, Nuño L, Clavijo C, Luna L, Souza V, Bucio L, Miranda R, Muñoz L, Gómez Q, Uribe C, Gutierrez R, 2016.** Hepatocyte growth factor reduces free cholesterol-mediated lipotoxicity in primary hepatocytes by countering oxidative stress. *Hindawi Pub Corp* 2016: 1-8.
- Fortis B, Alarcón A, Banderas D, Díaz F, Román R, Cruz M, García M, 2013.** *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *J Pharm Pharmacol* 65(10): 1563-1576,
- García G, 2011.** Proliferación de células β pancreáticas en ratones diabéticos tratados con *C. ficifolia* Bouché. Tesis de Maestría en Biología Experimental, UAM-Iztapalapa (UAMI), pp 1-74.

- Hancock R, Chudek J, Walker P, Pont S, Viola R, 2008.** Ascorbic acid conjugates isolated from the phloem of Cucurbitaceae. *J Phytochem* 69: 1859-1858.
- Hauner H, 2002.** The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev* 18(2): S10-S15.
- Hernández E, Campos A, Alarcón A, Vázquez L, Flores J, Román R, 2002.** Acute toxicological study of *Cucurbita ficifolia* juice in mice. *Proc West Pharmacol Soc* 45: 42-43.
- Hernandez Y, Torres H, Carrasco M, Nasiff H, Elías C, Pérez P, Fernández V, 2011.** Tratamiento farmacológico de la prediabetes. *Rev Cubana de Endocrinol* 22(1): 36-45.
- Horton R, Moran A, Scrimgeour K, Perry M, Rawn J, 2008,** Principios de Bioquímica, 4ª Ed, Ed. Pearson Prentice Hall, pp. 327-412.
- Hur K y Lee M, 2015.** New mechanisms of metformin action: focusing on mitochondria and the gut. *JDI* 6(6): 600-609.
- International Diabetes Federation, 2015.** IDF Diabetes atlas 7ª Edición.
- Im S, Kang S, Kim S, Kim H, Kim J, Kim K, Ahn Y, 2005.** Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene in mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. *Diabetes* 54(6): 1684-1091.
- Jensen T, Richter E, 2011.** Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol* 590 (5): 1069-1076.
- Jeong T, Kyung S, Dong W, Kyung S, Yoon S, Chung D, Tae S, Bong S, In Kyu, Joong Y, Hyun S, Moon K, Kwang W, Young S, 2010.** Regulation of glucose control in people with type 2 diabetes: A review and consensus. *Korean Diab J* 34: 16-20.
- Judi L, Toukan A, Khandar Y, Ajlouni K, Khatib MA, 2010.** Prevalence of elevated hepatic transaminases among Jordanian patients with type 2 diabetes mellitus, *Ann Saudi Med* 30(1): 25-32.
- Kaira S, 2014.** Alpha glucosidase inhibitors. *J Pak Med Assoc* 64(4): 474-476.
- Kim C, Subedi L, Park K, Kim S, Chou S, Kim K, Lee K, 2015.** Salicin derivatives from *Salix glandulosa* and their biological activities. *Fitoterapia* 106: 147-152.
- Lee H, Kim K, Kang K, Lee E, Kim C, Um B, Jung S, 2010.** The compound isolated from the leaves of *Phyllostachys nigra* protects oxidative stress-induced retinal ganglion cells death, *Food Chem Toxicol* 48(6): 1721-1727.
- Lima L, Buss G, Ishii I, Salgueiro P, Comar J, Bracht A, Constantin J, 2006.** Metabolic effects of *p*-coumaric acid in the perfused rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 20(1): 18-26.
- MacAulay K y Woodgett J, 2008.** Targeting glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 12(10): 1265-1274.
- Mahdi J, 2014.** Biosynthesis and metabolism of β -D-salicin: A novel molecule that exerts biological function in humans and plants. *Biotech Report* 4: 73-79.
- Mahía V y Pérez P, 2000.** La diabetes mellitus y sus complicaciones vasculares: un problema social de salud. *Rev Cubana Angiol Cir Vasc* 1(1): 68-73.

- Manuja R, Sachdeva S, Jain A, Chaudhary J, 2013.** A comprehensive review on biological activities of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives. *Int J Pharm Sci Rev Res* 22(2): 109-115.
- Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tatussio D, Bady I, Binnert C, Beermann F, Thorens B, 2005.** Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors, *J Clin Invest* 115(12): 3545-3553.
- Nusrat J, Wasim A, Abdul M, 1995.** New steroidal glycosides from *Mimusops Elengi*, *J Nat Prod.*, 58: 1244-1247.
- NOM-015-SSA2-2010.** Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- NOM-062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ohtani K, Fujioka S, Kawano T, Shimada A, Kimura Y, 2011.** Nematicidal activities of 4-hydroxyphenylacetic acid and oidiolactone D produced by the fungus *Oidiodendron* sp., *Z Naturforsch* 66 (1-2): 31-34.
- Olvera G, Leo A, Hernández M, 2008.** Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?, *Bol Med Hosp Infant Méx*, 65: 306-324.
- Ou Y, Lin L, Pan Q, Yang X, Cheng X, 2012.** Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxan-injured mice. *Env Toxicol Pharm* 34(3): 721-726.
- Papeleu P, Vanhaecke T, Henkens T, Elaut G, Vinken M, Snykers S, Rogiers V, 2006.** Isolation of rat hepatocytes. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj*, 320(3): 229-237.
- Passonneau J, Lauderdale V, 1974.** A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Analyt Biochem* 60(2): 405-412.
- Pereira D, Vantao P, Pereira J, Andrade P, 2009.** Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* 14: 2202-2211.
- Peungvicha P, Temsiririrkkul R, Prasain J, Tezuka Y, Kadota S, Thirawarapan S, Watanabe H, 1998.** 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. *J Ethnophar* 62(1): 79-84.
- Pianaro A, Pereira P, Trevistan F, Kazue I, Braz F, 2007.** Iridoid glucoside and antifungal phenolic compounds from *Spathodea campanulata* roots. *Semina: Ciencias Agrarias, Londrina* 28: 251-256.
- Presnell J, Schreibcam M, 1997.** Humason,s animal tissue techniques. 5ª Edición. Baltimore, *The Johns Hopkins University Press*. pp 572.
- Preston B, Lyon T, Yin Y, Lang J, Solomon G, Annab L, Srinivasan D, Alcorta D, Barrett J, 1996.** Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol*, 16(1): 211-128.
- Prophet B, Arrington B, Sobin H, MD, 1995,** Métodos Histotecnológicos, *AFIP*, pp 153-154.

- Recio M, Bonucelli M, Orsi C, Máñez S, Giner R, Cerdá N, Ríos J, 2004.** Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Med* 70: 414-420.
- Roman R, Alarcón F, Lara A, Flores J, 1992.** Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch Med Res.* 23: 105-109.
- Román R, Almanza P, Fortis B, Angeles M, Banderas D, Zamilpa A, Diaz F, Jasso I, Blancas F, Gómez J, Alarcón A, 2012.** Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouche in streptozotocin-induced diabetes mice. *Am J Chinese Med* 40(1): 1-14.
- Roper N, Bilous R, Kelly W, Unwin N, Connolly V, 2002.** Cause specific mortality in a population with diabetes: South tees diabetes mortality study. *Diab Care* 25(1): 43-48.
- Sawants S, Dnyanmote A, Warbritton A, Latendresse J, Mehendale H, 2006.** Type 2 diabetic rats are sensitive to thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 211(3): 221-232.
- Sajad H y Mohod M, 2009.** Histopathological abnormalities of prolonged alloxan-induced diabetes mice in rabbits. *Int J Exp Pathology* 90(1): 66-73.
- Schinner S, Scherbaum W A, Bornstein S R y Barthel, 2005.** A. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance. *Diabet Med* 22: 674-682.
- Seo S, Uomori A, Yoshimura Y, Sankawa U, Ebizuka Y, 1987.** Stereospecificity in the side-chain formation of 24 β -ethylsterols in tissue cultures of *Trichosanthes kirilowii*. *J Chem Soc Chem Commun* 1876-1878.
- Seung S, Seung Y, So Y, Ha I, Jae W, Kyung S, Yong H, 2005.** Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. *Diabetes* 54: 1684-1691.
- Shankar K, Vaidya V, Wang T, Bucci T, Mehendale H, 2003.** Streptozotocin-induced diabetic mice are resistant to lethal effects of thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 188(2): 122-134.
- Shaw J, Sicree R, Zimmet P, 2010.** Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diab Res Clin Pract* 87(1): 4-14.
- Singh V, Bali A, Singh N, Jaggi S, 2014.** Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol* 18(1): 1-14.
- Sola D, Rossi L, Carnevale S, Maffioli P, Bigliocca M, Mella R, Corliano F, Paolo F, Bartoli E, Derosa G, 2015.** Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 11(4): 840-848.
- Sub K, Subedi L, Jin P, Yeou K, Un C, Hyun K, Ro L, 2015.** Salicin derivatives from *Salix glandulosa* and their biological activities. *Fitoterapia* 106: 147-152.

- Shaw J, Sicree R, Zimmet P, 2010.** Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87(1): 4-14.
- Stravodimos G, Chetter B, Kyriakis E, Kantsadi A, Chatzileontiadou D, Skamnaki V, Kato A, Hayes J, Leonidas D, 2016.** Phytogetic polyphenols as glycogen phosphorylase inhibitors: the potential of triterpenes and flavonoids for glycaemic control in type 2 diabetes. *Curr Med Chem* 23.
- Stryer L, Berg M, Tymoczko L, 2003.** Bioquímica, 5th Ed. Barcelona España, Ed. Reverte, pp. 577-580.
- Taborsky G, 2010.** The physiology of glucagon. *J Diab Science Tech* 4(6): 1338-1344.
- Tagliabracci V, Heiss C, Karthik C, Contreras C, Glushka J, Ishihara M, Azadi P, Hurley T, DePaoli R, Roach P, 2011.** Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease. *Cell Metab* 13(3): 274-282.
- Torres S, 2002.** Manual de técnicas en Histología y Anatomía Patológica, Ed Ariel, 1ª Edición, Barcelona España, pp. 77.
- Violet B, Guigas B, Sanz G, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F, 2012.** Celular and molecular mechanism of metformin: and overview. *Clin Sci (Lond)* 122(6): 253-270.
- Voet D y Voet J, 2006.** Bioquímica, 3a Edición, Editorial Médica Panamericana, pp. 601-680.
- Wang S, Huang W, Liu C, Wang M, Ho C, Huang W, Hou C, Chuang H, Huang C, 2012.** Pumpkin (*Cucurbita moschata*) fruit extract improves physical fatigue and exercise performance in mice. *Molecules* 17(10): 11864-11876.
- Wang D, Xiang H, Il D, Gao H, Cai H, Wu L, Deng X, 2008.** Purine-containing cucurbitane triterpenoids from *Cucurbita pepo* cv dayangua. *Phytochemistry* 69: 1434-1438.
- Whiting D, Gurariguata L, Weil C, Shaw J, 2011.** IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94(3): 311-321.
- Wilcox G. 2005.** Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26(2): 19-39.
- Winnick J, An Z, Ramnanan C, Smith M, Irimia J, Neal D, Moore M, Roach P, Cherrington A, 2011.** Hepatic glycogen supercompensation activates AMP-activated protein kinase, impairs insulin signaling, and reduces glycogen deposition in the liver. *Diabetes* 60(2): 398-407.
- Xia T, Wang Q. 2006a.** Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Fitoterapia* 77: 530-533.

- Xia T, Wang Q. 2006b**, D-chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 58: 1527-1532.
- Xu K, Morgan K, Todd G, Elston T, Gomez S, 2011**. A whole-body Model for glycogen regulation reveals a critical role for substrate cyclin in maintaining blood glucose homeostasis. *PLOS Computational Biology* 7:1-13.
- Zhang X, Liang W, Mao Y, Li H, Yang Y, Tan H, 2009**. Hepatic glucokinase activity is the primary defect in alloxan-induced diabetes of mice. *Biomed Pharmacother* 63(3): 180-186.
- Zimmet P, Alberti K, Shaw J, 2001**. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.

Garcia Gonzalez Jessica¹, Garcia Lorenzana Mario², Zamilpa Alejandro³, Almanza Perez Julio Cesar⁴, Jasso Villagomez E. Ivan⁴, Roman Ramos Ruben⁴, Alarcon-Aguilar Francisco Javier^{4*}.

¹Postgrad in Experimental Biology, Division of Health and Biological Sciences (DCBS), Metropolitan Autonomous University Campus Iztapalapa (UAMI), D.F. Mexico 09340, Mexico. ²Neurobiology Tissue Laboratory, Department of Reproduction Biology, DCBS, UAMI D.F. Mexico 09340, Mexico. ³Biomedical Research Center South (CIBIS), Mexican Institute of Social Security (IMSS) Xochitepec, Morelos 62790, Mexico. ⁴Pharmacology Laboratory, Department of Health Sciences, DCBS, UAMI, D.F. Mexico 09340, Mexico.

*Corresponding author E-mail: aaaf@xanum.uam.mx

Abstract

Background: The aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* (*C. ficifolia*) fruit has demonstrated hypoglycemic effect, which may be attributed to some components in the extract. However, the major secondary metabolites in this fruit have not yet been identified and little is known about its extra-pancreatic action, in particular, on liver carbohydrate metabolism. Therefore, in addition to the isolation and structural elucidation of the principal components in the aqueous extract of *C. ficifolia*, the aim of this study was to determine whether or not the hypoglycemic effect of the aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* (*C. ficifolia*) fruit is due to accumulation of liver glycogen in diabetic mice.

Materials and Methods: The aqueous extract from fruit of *C. ficifolia* was fractionated and its main secondary metabolites were purified and chemically characterized (NMR and GC-MS). Alloxan-induced diabetic mice received daily by gavage the aqueous extract (30 days). The liver glycogen content was quantified by spectroscopic method and by PAS stain; ALT and AST by spectrometric method; glycogen synthase, glycogen phosphorylase and GLUT2 by Western blot; the mRNA expression of GLUT2 and glucagon-receptor by RT-PCR; while serum insulin was quantified by ELISA method. A liver histological analysis was also performed by H&E stain.

Results: Chemical fingerprint showed five majoritarian compounds in the aqueous extract of *C. ficifolia*: *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid, salicin, stigmast-7,2,2-dien-3-ol and stigmast-7-en-3-ol. The histological analysis showed accumulation of liver glycogen. Also, increased glycogen synthase and decreased glycogen phosphorylase were observed. Interestingly, the histological architecture evidenced a liver-protective effect due the extract.

Conclusion: Five compounds were identified in *C. ficifolia* aqueous extract. The hypoglycemic effect of this extract may be partially explained by liver glycogen accumulation. The bioactive compound responsible for the hypoglycemic effect of this extract will be elucidated in subsequent studies.

Key words: *Cucurbita ficifolia*, Cucurbitaceae, liver glycogen, hypoglycemic plants, *p*-coumaric acid, salicin, *p*-hydroxybenzoic acid.

Introduction

Cucurbita ficifolia Bouche (Cucurbitaceae), popularly known as "chilacayote" in Mexico, is a plant whose edible fruits are empirically used as anti-diabetic remedy (Alarcon et al., 2002). *C. ficifolia* has demonstrated hypoglycemic effects in several diabetes animal models, and in type-2 diabetic patients (Acosta et al., 2001; Alarcon et al., 2002; Xia and Wang, 2006a). This hypoglycemic effect of *C. ficifolia* has been associated with promoting insulin secretion and rise in mRNA expression of insulin and Kir6.2 in RINm5F cells (Miranda et al., 2013). Despite evidence supporting the hypoglycemic effect of *C. ficifolia* at pancreatic level, little is known about its extra-pancreatic actions, particularly on the carbohydrate metabolism modulated by the liver. In this sense, Xia and Wang (2006b) suggested that the hypoglycemic effect of *C. ficifolia* might implicate changes in hepatic glycogen. However, this has not yet been confirmed through histological and biochemical studies that include the quantification of glycogen and evaluation of the enzymes involved in the liver glycogen synthesis and its degradation.

In relation to the phytochemical studies of *C. ficifolia* fruit, Xia and Wang (2006b) proposed to D-chiro-inositol (DCI) as one of the principal components and as one of the probable responsible of its hypoglycemic effect. In addition, nicotinamide, polyphenols, flavonoids and cucurbitacin triterpenes have been identified in *C. ficifolia* aqueous extract, which also might participate in this hypoglycemic effect; in fact, a hypoglycemic effect of similar intensity has been observed in a free DCI aqueous extract (Banderas et al., 2012; Fortis et al., 2013; Roman et al., 2012). Therefore, apart of DCI, other compounds should be participating in the hypoglycemic effect of *C. ficifolia*. As in different phytochemical studies with the aqueous extract of *C. ficifolia* have been observed differences in its composition, it is

necessary to perform a chemical analysis to determine the majoritarian compounds in this extract through of its chemical fingerprint. Therefore, in addition to the isolation and structural elucidation of the main components in this extract, the aim of this study was to establish whether the hypoglycemic effect of *C. ficifolia* involves the accumulation of liver glycogen in diabetic mice through the analysis of the key enzymes involved in the synthesis and degradation of liver glycogen and examination of liver histological architecture.

Materials and Methods

Authentication of plant

Fresh mature fruits of *C. ficifolia* Bouche (Cucurbitaceae) were collected, taking into account the international and Mexican rules concerning the biodiversity rights, in May 2012, at San Bartolo el Chico, Acolman, Estado de Mexico, Mexico. Experts at Mexican Institute of Social Security carried out the botanical identification (IMSSM-Herbarium, Voucher Specimen Num. 11119).

Extract preparation

The aqueous extract was obtained in accordance with the method reported by Fortis et al., 2013. The dried ripe fruit (100 g) was macerated with water (1:1) for 72 h; the aqueous phase was recovered every 24 h. The supernatant was filtered and freeze-dried (yield 5%).

Structural characterization of the main components in *C. ficifolia*

The chromatographic fingerprint of the active extract was taken by HPLC, in a Waters liquid chromatography system equipped with a separation module system (Waters, Massachusetts, USA) and a photodiode array detector (Waters, Massachusetts, USA), using the Empower Pro software. Separation was carried out using a Prevail C-18 column (Grace, 150 x 4.6 mm; 5 μ m; Columbia, Illinois, USA). The mobile phase consisted of a mixture of trifluoroacetic acid solution (0.5 %, solvent A) and acetonitrile (solvent B) in several ratios. The detection wavelength was scanned at 190-600 nm. As a concentration of 3 mg/ml of the aqueous extract gave a low fingerprint 100 mg of dry extract was suspended in 5 ml methanol (20 mg/ml) to increase the concentration of secondary metabolites. Commercial standards (Sigma Aldrich, Missouri, USA) of *p*-coumaric acid, gallic acid, catechin, nicotinamide and rutin were compared with the aqueous extract under these chromatographic conditions. Quantification of *p*-coumaric acid was achieved using several doses of a commercial standard following the same described HPLC method.

For DCI detection, it was used the previously HPLC method described by Banderas et al. (2012). The limit of detection (LoD= 50 μ g/ml) and limit of quantification (LoQ=137 μ g/ml) were determined (signal-noise ratio) and under these analytical parameters, the DCI compound was not detected in this *C. ficifolia* extract. All NMR spectra were recorded on an Agilent DD2 600 spectrometer (Agilent Technologies, California, USA), at 600 MHz for ¹H NMR, ¹H-¹H COSY, HSQC and HMBC, and at 150 MHz for ¹³C NMR in CDCl₃.

Spectrometric analysis was carried out on a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Agilent Technology 6890, California, USA) equipped with a quadrupole mass detector in electron impact mode at 70 eV. Volatile compounds were separated on an HP 5MS capillary column and compared with their mass spectra of the National Institute of Standards and Technology (NIST) 1.7 Library.

Isolation and identification of major compounds from *C. ficifolia*

A portion of the aqueous extract (70 g) was fractionated by silica gel 60 in an open chromatographic column (100 g, 70-230 mesh, Merck Millipore, Massachusetts, USA). The mobile phase consisted of a mixture of *n*-hexane: isopropanol, resulting in two fractions: CfC1F1 (1.8 g) and CfC1F2 (1.7 g). The fraction CfC1F1 (1.8 g) was loaded onto open column chromatography with silica gel 60 (15 g, 70-230 mesh, Merck Millipore, Massachusetts, USA), using a gradient system with *n*-hexane: ethyl acetate-methanol mixture, resulting in 12 fractions. The spectrometric analysis of CfC2F5 showed the presence of stigmast-7,22-dien-3-ol and stigmast-7-en-3-ol, respectively (Table 1). The chemical structure of these phytosterols was confirmed by ¹H and ¹³C NMR (Jahan et al., 1995; Seo et al., 1987). The CfC1F2 fraction (1.7 g) was again fractionated on a RP-18 silica gel column (10 g, 230-400 mesh, POLYGOPREP C18, Macherey-Nagel, Pennsylvania, USA), eluted with a gradient system of water: acetonitrile to give 49 fractions (CfC3F1-CfC3F49). Since the fractions CfC3F9-CfC3F12 (58.9 mg) contained the major secondary metabolites of the active extract, this mixture was subjected to a new chromatographic process on a reverse phase column (6 g of silica gel 60-50 POLYGOPREP, Macherey-Nagel, Pennsylvania, USA) by means of a gradient system of water: acetonitrile mixture, which yielded fractions CfC4F1-CfC4F24. Analysis by ¹H and ¹³C NMR of the fraction CfC4F7 (10.2 mg) showed the presence of salicin (Table 2) in the active extract (Kim et al., 2015). Finally, the CfC4F14- CfC4F18 fractions were purified to obtain CfC5F9 by the same reverse phase chromatographic process, whose ¹H and ¹³C NMR analysis resulted in *p*-hydroxybenzoic acid (Table 3). The CfC5F20 fraction showed a retention time and a UV spectrum similar to *p*-coumaric acid.

Laboratory animals

Male CD-1 strain mice (Harlan, Indiana, USA), weighing 30-35 g, and 6-8 weeks of age were obtained of the laboratory animal center at Autonomous Metropolitan University campus Iztapalapa. The mice were housed in a 12-h light/dark cycle; basic diet and drinking water were given ad libitum. The handling of laboratory animals was performed in agreement with the statutes of the ICCUA (Institutional Committee for the Care and Use of the Animals, session 8.10, revised in 2010) and the Official Mexican Rule (NOM-062-Z00-1999, revised in 2001).

Acute hypoglycemic effect of *C. ficifolia* in normal and alloxan-induced diabetic mice

The hypoglycemic effect of *C. ficifolia* extract was evaluated in normal mice and alloxan-induced diabetic mice (two single intravenous doses of 70 mg/kg of alloxan dissolved in ISS). After one week of alloxan administration, normal mice in fasting (3 groups of 5 animals each) and alloxan-induced diabetic mice with free access to food (3 groups of 5 animals each) were subjected to the following treatments: The Groups-1 received 4 ml/kg of isotonic saline solution (Normal control and Diabetic control); in agreement with previous reports in which an dose of 200 mg/kg was used to induce hypoglycemic effect in experimental animals (Banderas et al., 2012; Fortis et al., 2013), the Groups-2 received a dose of *C. ficifolia* extract of 200 mg/kg, equivalent to 11.6 µg/kg of *p*-coumaric acid (Normal *C. ficifolia* and Diabetic *C. ficifolia*); while Groups-3 received 5 mg/kg of glibenclamide (Normal glibenclamide and Diabetic glibenclamide), a sulphonylurea agent with hypoglycemic action that acts at pancreatic level as insulin secretagogue (Krentz and Bailey, 2005; Inzucchi et al., 2012). The administration of the treatments was by intra-peritoneal route; before the administration of the treatments, the blood glucose levels were determined at start, and after at different time intervals (120, 240 and 360 min).

Sub-chronic hypoglycemic effect of *C. ficifolia* in alloxan-induced diabetes mice

Four groups of mice were used: Group 1 consisted of normal mice (4 ml/kg of ISS); while Groups 2, 3 and 4 were alloxan-induced diabetic mice. After one week of the administration of alloxan, Group-1 received ISS (4 ml/kg/day, Normal control); Group- 2 also received ISS (4 ml/kg/day, Diabetic control); Group-3 received the extract of *C. ficifolia* (200 mg/kg/day, equivalent to 11.6 µg/kg/day of *p*-coumaric acid); and the Group-4 received 50 mg/kg/day of metformin, a biguanide whose anti-hyperglycemic effect, mainly extra-pancreatic, has been in part attributed to inhibition of the liver glycogenolysis because reduces hepatic glucose production (Carroll et al., 2002; Krentz and Bailey, 2005;). All treatments were given by gavage for 30 days.

Measurements of parameters

Biochemical parameters were quantified from the blood samples obtained from the retro-orbital venous sinus in anesthetized mice. Accu-Check Sensor Comfort (Roche Diag., Indiana, USA) was used to measure glycemia, and both ALT and AST were determined using a Reflotron Plus system (Roche Diag., Indiana, USA). Insulin was quantified in serum samples using enzyme-linked immune-absorbent assay kits for mouse insulin (Lynco Research, Missouri, USA). The glycogen was extracted from liver by digestion with 30% KOH followed by precipitation with ethanol 95%. The absorbance spectrum of a glycogen standard (Sigma Aldrich, Missouri, USA) was recorded at 620 nm. The samples were diluted 1:50 in distilled water. The results reflect the absorbance obtained and are expressed as mg of glycogen per g of dry liver (Passonneau and Lauderdale, 1974).

Histology

Liver tissue was fixed and dehydrated. After its inclusion with Paraplast (Oxford Labware, Missouri, USA), the tissue was cut transversally and stained with hematoxylin-eosin (H&E) (Presnell and Schreiber, 1997) and Periodic Acid Schiff (PAS) (Prophet et al., 1992). Slices were analyzed using a light microscope Axioskope 2 (Carl Zeiss, New York, USA). Quantification of the positive area of PAS-stained was performed using the Axiovision Program 4.8 (Carl Zeiss, New York, USA) by analyzing 5 samples of each treatment at 400x magnification using a range of Red 58-196, Green 0-90, and Blue 46-203.

RNA extraction and real-time RT-PCR analysis

RNA was isolated from liver tissue by using RNeasy Tissue Mini RNA extraction kit (Qiagen Sciences, Maryland, USA) according to the manufacturer's protocols. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using the ImProm II reverse transcription system (Promega, Wisconsin, USA). The reaction (20 µl) was incubated in a thermocycler (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700HT; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Then, cDNA was amplified with SYBR Green master mix (Roche Diag., Indiana, USA) containing 0.5 mM of custom primers for the glucagon receptor (Gcgr) (F5'-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3', R5'-GCCACCTCTTTGCTCTGCTC-3'), GLUT-2 (Slc2a2) (F5'- ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC-3', R5'-

220

GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3') or a housekeeping gene *36B4* (F5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3', R5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3') as an internal control, Fast Star Enzyme, PCR buffer and 3.5 mM MgCl₂ in a final volume of 10 µl. The reactions were measured in the Rotor-Gene real-time (Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australia). PCR was conducted using the protocol reported by Almanza et al. (2010). The abundances of *Gcgr* mRNA were normalized by the abundance of mRNA encoding *36B4*. The Δ Ct values were calculated in every sample for each gene of interest as follow: $Ct_{\text{interest}} - Ct_{\text{reference}}$ with *36B4* as the reference gene (mRNA of reference remained stable throughout the experiments). Relative changes in the expression level of one specific gene ($\Delta\Delta$ Ct) were calculated as $\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{reference}}$ and then presented as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Almanza et al., 2010).

Western blotting

Total protein was isolated from liver tissue using a protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), containing 1% halt protease inhibitor mixture (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and 100 mM sodium orthovanadate. Two hundred milligrams of total protein were separated on NuPAGE Novex 4-20 % SDS gels (Invitrogen, California, USA) transferred to PVDF membranes (Invitrogen, California, USA) and probed with glycogen synthase 2-antibody (G-8), glycogen phosphorylase antibody (PYGB/L/M Antibody N-20) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) and GLUT-2 (Abcam, Massachusetts, USA) according to manufacturers' instructions. Immune-reactive bands were identified with ECL-Plus Western blotting detection reagent (GE Healthcare, Illinois, USA), using anti-mouse and anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Equal loading was verified by probing the membrane with anti-actin (Clavijo et al., 2014).

Statistical analysis

Data are expressed as mean±S.E.M. and were processed using NCSS 2007 software (Kaysville, UT, USA). Differences between groups were analyzed by two-way ANOVA and post hoc Tukey-Kramer test ($p < 0.05$).

Results

Phytochemical analysis of *C. ficifolia*

A comparison of the fingerprints of aqueous extract versus methanol extract confirmed the necessity of enriching the secondary metabolites by methanol precipitation. Of all the principles analyzed, only the presence of *p*-coumaric acid was confirmed; therefore, the other compounds were excluded as marker compounds for standardization of the extract. The CfC2F5 fraction from column 2 was analyzed by GC-MS, and two major compounds at 35.4 min and 36.6 min were observed, which corresponded to stigmast-7,22-dien-3-ol and stigmast-7-en-3-ol, respectively. Spectroscopic data of these phytosterols are described in Table 1. The CfC5F7 fraction contained a chemical compound (R.T.= 8.54 min) with identical ¹H and ¹³C NMR data (Table 2) to salicin (Kim et al., 2015). The CfC5F9 fraction corresponded to one of the major peaks in the chromatogram of *C. ficifolia* (R.T.= 10.0 min). The structure of this compound was identified by 2D NMR experiments (¹H-¹H COSY, ¹³C-HSQC and HMBC, Table 3) as *p*-hydroxybenzoic acid. The CfC5F20 fraction had the same retention time (15.9 min) and ultraviolet spectra ($\lambda_{\text{max}} = 310$ nm) as coumaric acid. The amount of *p*-coumaric acid in 1 g of extract was quantified using a previously described standard curve, which indicated 58 µg of *p*-coumaric acid/g of extract (11.6 µg in 200 mg of *C. ficifolia* extract).

Acute and sub-chronic hypoglycemic effect of *C. ficifolia* in normal and alloxan-induced diabetic mice

In the acute study, the basal glycemia was similar among groups (Figure1A). When *C. ficifolia* aqueous extract was administered, there were significant reductions in glycemia ($p < 0.05$) at 240 and 360 min in normal mice. Glibenclamide produced a significant reduction in glycemia at 120, 240 and 360 min. In diabetic mice, there were significant reductions in glycemia ($p < 0.05$) at 360 min with both *C. ficifolia* and glibenclamide (Figure1B). In the sub-chronic test, the glycemic values were significantly higher in diabetic mice (Alloxan ISS) than in Normal control mice. *C. ficifolia* decreased glucose levels by 25% with respect to the diabetic control ($p < 0.05$) (Figure1C). In contrast, metformin provoked a non-significant decrease in glucose levels. Insulin levels were not modified with any of the treatments (data not shown).

Effect of *C. ficifolia* on liver glycogen storage

The PAS stain was used to determine the liver glycogen content, which is shown in pink (Figure2A-D); the distribution and accumulation of carbohydrates, and primarily glycogen, is evident. In the *C. ficifolia* group, the glycogen accumulation was increased and heterogeneously distributed throughout the liver parenchyma (Figure2C). Metformin showed a similar result (Figure2D). Diabetic control showed less glycogen distributed through the parenchyma (Figure2B). *C. ficifolia* quantitatively increased glycogen liver content by 195% ($p < 0.05$) with respect to diabetic control (Alloxan ISS) (Figure2E). Metformin augmented the glycogen liver content by 158% against diabetic

control ($p < 0.05$) (Figure 2E). The PAS-staining showed an increase in area dye in the *C. ficifolia* group compared with the diabetic control ($p < 0.05$) (Figure 2F).

Table 1: ^{13}C NMR spectral data (ppm) of stigmast-7,22-dien-3-ol and stigmast-7-en-ol in fraction Cfc2F5 and previously reported data by Jahan et al., 1995., and Seo et al., 1987.

Carbon number	Stigmast-7,22-dien-3-ol		Stigmast-7-en-ol	
	Cfc2F5 fraction	Jahan et al., 1995	Cfc2F5 Fraction	Seo et al., 1987
1	37.91	37.0	37.11	37.16
2	31.41	27.6	31.85	31.47
3	71.06	74.0	71.06	71.05
4	37.91	33.9	37.91	37.97
5	40.24	40.4	40.24	40.27
6	29.68	29.4	29.68	29.67
7	117.43	117.2	117.43	117.43
8	139.45	139.6	139.45	139.59
9	49.43	49.0	49.43	49.47
10	34.2	34.4	34.2	34.21
11	21.53	---	21.53	21.57
12	39.54	39.6	39.45	39.58
13	43.37	41.3	43.26	43.38
14	55.02	55.6	51.23	55.05
15	23.05	23.1	22.95	22.99
16	28.49	28.4	27.95	27.97
17	55.88	55.8	56.07	56.08
18	12.23	12.0	11.82	11.85
19	13.02	12.5	13.02	13.04
20	40.8	40.2	36.57	36.73
21	21.07	21.0	18.97	18.98
22	138.14	138.0	33.87	33.88
23	129.42	129.6	26.18	26.52
24	51.23	51.3	45.82	46.07
25	31.85	31.8	29.14	28.97
26	19.02	19.2	18.97	18.98
27	21.53	---	19.81	19.61
28	25.38	25.5	23.05	23.01
29	12.03	12.6	12.23	12.33

Table 2: ^1H NMR spectral data (ppm) of salicin in the Cfc4F7 fraction of *C. ficifolia* and reported data by Kim et al., 2015.

^1H RMN	Salicin	
	Cfc4F7 fraction	Kim et al., 2015
1	---	---
2	---	---
3	7.41 (brd, 6.94)	7.32 (dd, 7.7, 1.4)
4	7.28 (brd, 6.94)	7.01 (td, 7.7, 0.7)
5	7.04 (d 8.4)	7.19 (td, 7.7, 1.4)
6	7.36 (d, 8.4)	7.12 (brd, 7.7)
7a	4.66 (d, 11.56)	4.78 (d, 12.6)
7b	4.93 (d, 11.56)	4.57 (d, 12.6)
1	4.35 (d, 7.7)	4.83 (d, 7.7)
2'	3.34 (dd, 7.71, 8.4)	3.51 (dd, 8.4, 7.7)
3'	3.35 (t, 8.4)	3.46 (t, 8.4)
4'	3.31 (overlap)	3.39 (overlap)
5'	3.25 (m)	3.65 (ddd, 9.8, 6.3, 2.1)
6a	3.69 (dd, 5.4, 11.56)	4.49 (dd, 11.9, 2.1)
6'b	3.89 (dd 2.31, 11.5)	4.32 (dd, 11.9, 6.3)

Table 3: ¹³C and ¹H NMR spectral data (ppm) of the p-hydroxybenzoic acid in CfC5F9 fraction and reported data by Pianaro et al., 2007.

Carbon number	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid			
	CfC5F9 fraction		Pianaro et al., 2007.	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	170.18	---	170.07	---
2	122.83	---	122.73	---
3	132.97	7.87	132.99	7.86
4	116.00	6.82	116.03	6.80
5	163.27	---	163.36	---
6	116.00	6.83	116.03	6.80
7	132.97	7.88	132.73	7.86

Influence of *C. ficifolia* in glycogen synthase and glycogen phosphorylase of liver

C. ficifolia provoked a significant ($p < 0.05$) increase in glycogen synthase enzyme levels against diabetic control (Figure3A and 3B). Metformin showed a non-significant increase. *C. ficifolia* and metformin reduced glycogen phosphorylase (PYGB) compared with the control alloxan group (Figure3A and 3C). *C. ficifolia* and metformin increased in a non-significant manner GLUT-2 (Figure3A and 3D).

Effect of *C. ficifolia* extract on mRNA expression of GLUT-2 and glucagon

The extract of *C. ficifolia* did not change the expression levels of GLUT-2 nor of glucagon receptor after 30 days of treatment in diabetic control (Figure4A and 4B). Metformin improved the expression levels of GLUT-2 and glucagon receptor.

Effect of *C. ficifolia* on liver functionality and histology

The ALT and AST levels were observed significantly increased ($p < 0.05$) in diabetic control compared with normal control mice (Figure5A and 5B). *C. ficifolia* and metformin caused a significant decrease in the ALT and AST levels ($p < 0.05$). The photomicrographs of liver are shown in Figures 5C-F. The nuclei and nucleoli of hepatocytes were visualized eu-chromatics. The liver lobules (box), the liver central vein, the hepatic cords and some Kupffer cells located in the sinusoidal space, as well as some endothelial cells lining the vein center can be seen in Figure 5C. After 30 days of treatment, *C. ficifolia* did not show changes in liver histology (Figure5E), did not show changes in liver histology, preserving the overall structure of the hepatic lobe. Diabetic control showed disarrayed lobes, cellular damage and ballooning degeneration, which was confirmed by the presence of typical vesiculation, hydropic degeneration, karyorrhexis, karyolysis and altered cytoplasmic regions, as well as increased cytoplasmic acidophilia, vascular congestion, a state of hyperemia, and hydropic degeneration (Figure5D). Metformin provoked leukocyte infiltration mainly by neutrophils, which is characteristic of an inflammatory condition (Figure5F).

Discussion

The fruit of *C. ficifolia* has been reported to possess hypoglycemic activity in different experimental models, including rats, mice and rabbits, with moderate and severe experimental diabetes, and in type-2 diabetic patients (Alarcon et al., 2002; Acosta et al., 2001). These earlier studies have established that an oral dose of 200 mg/kg of *C. ficifolia* is enough to produce hypoglycemic effect. Therefore, this same dose was used in the present study. Results showed a hypoglycemic effect in acute and sub-chronic test by the aqueous extract of *C. ficifolia*. In addition, the chemical study of this extract allowed the identification of five majoritarian compounds: two phytosterols, i.e., stigmast-7,22-dien-3-ol and stigmast-7-en-3-ol, as well as p-coumaric acid, p-hydroxybenzoic acid and salicin. However, DCI was not detected in this active extract. As the p-hydroxybenzoic acid resulted be one of the main components in the extract and due to that it has been reported with hypoglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats (Manuja et al., 2013), this compound might be the responsible of the hypoglycemic effect of *C. ficifolia*. However, this should be confirmed in further studies and the other components in the extract cannot be yet discarded.

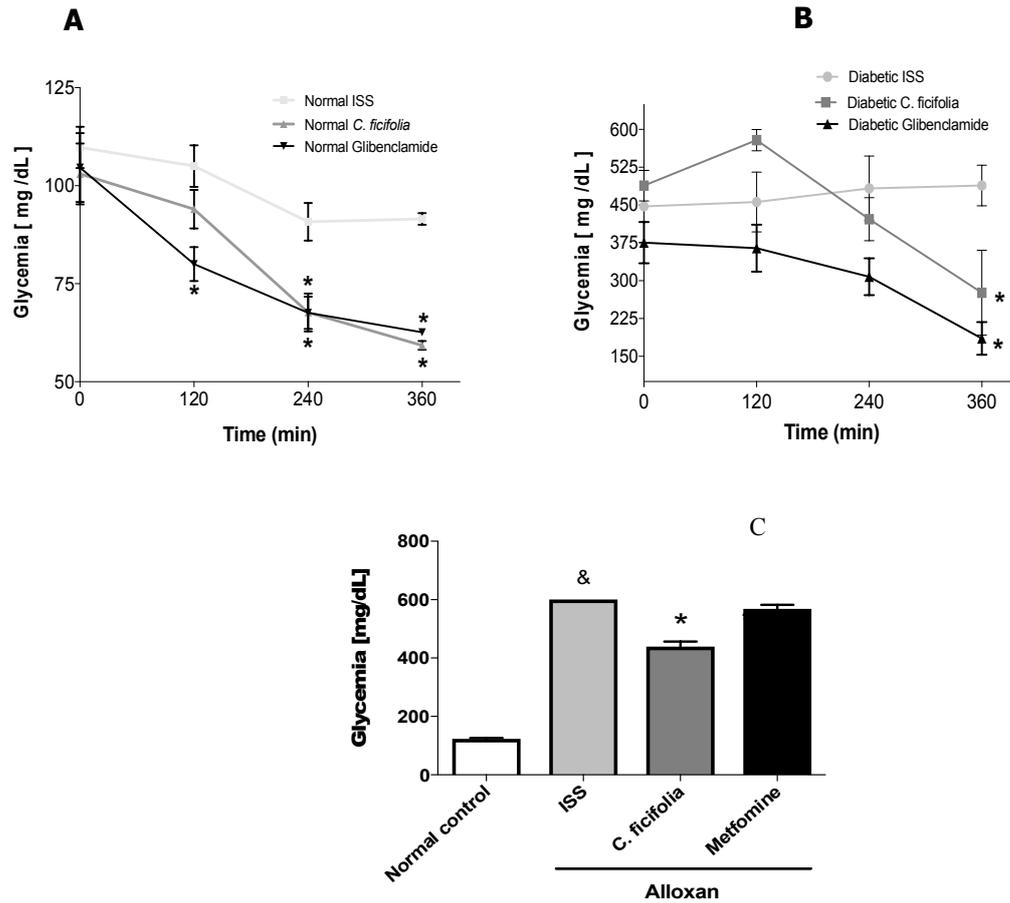


Figure 1: Acute hypoglycemic effect of *C. ficifolia* extract (200 mg/kg equivalent to 11.6 µg of *p*-coumaric acid/kg) and glibenclamide (5 mg/kg) in: **A**) Normo-glycemic mice, *significant difference against normal control (Normal ISS); **B**) Alloxan-induced diabetic mice, *significant difference against diabetic control (Diabetic ISS). **C**) Sub-chronic hypoglycemic effect by administration during 30 days of *C. ficifolia*-extract (200 mg/kg/day, equivalent to 11.6 µg/kg/day of *p*-coumaric acid) or metformin (50 mg/kg/day) in alloxan-induced diabetic mice, *significant difference against Normal control, &significant difference against diabetic control (Alloxan ISS). Mean±S.E.M. n=5 (p<0.05).

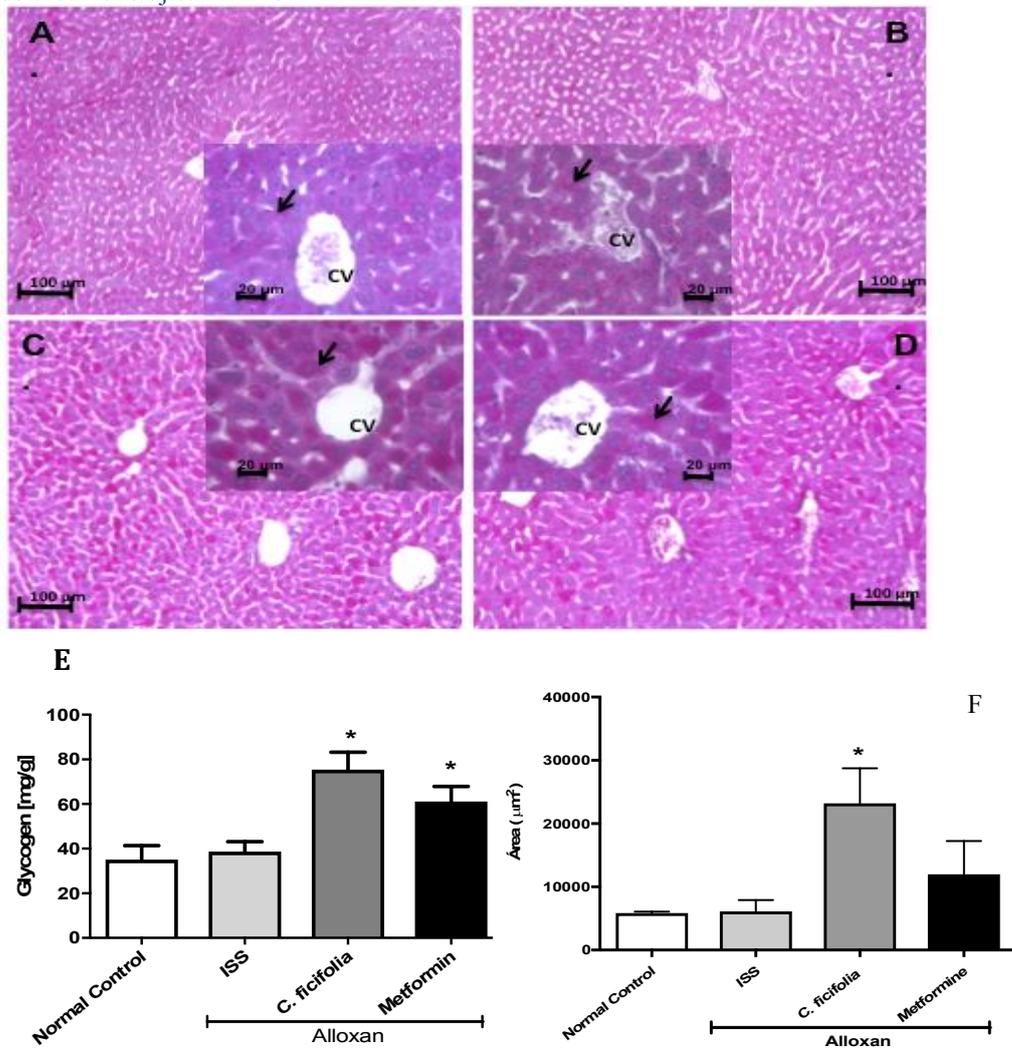


Figure 2: Photomicrographs with PAS staining in pink of transversal liver sections by administration during 30 days of *C. ficifolia*-extract (200 mg/kg/day, equivalent to 11.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of *p*-coumaric acid) or metformin (50 mg/kg/day) in alloxan-induced diabetic mice. **A)** Normal control. **B)** Diabetic control (Alloxan ISS). **C)** Alloxan treated with *C. ficifolia*. **D)** Alloxan treated with metformin. *C. ficifolia* extract increased the accumulation of liver glycogen. Hepatocyte cytoplasm with dense glycogen deposits (arrow) around the central vein (CV) can be observed. These accumulations are seen as pink PAS-positive areas throughout the section (original magnification 100x and box 400x). **E)** Quantitative analysis of glycogen content in diabetic mice liver tissue treated for 30 days with *C. ficifolia* extract. **F)** Quantitative analysis of positive PAS stained area. Mean \pm S.E.M. ($n=5$). *Significant difference against diabetic control (Alloxan ISS) ($p < 0.05$).

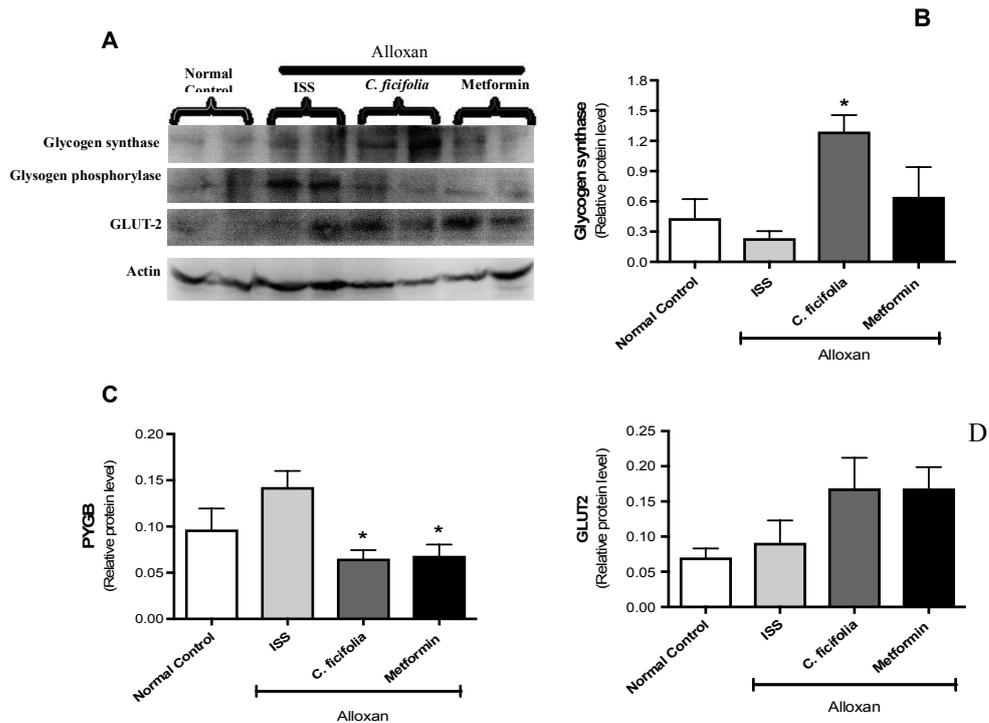


Figure 3: Effect of *C. ficifolia* extract (200 mg/kg/day, equivalent to 11.6 µg/kg/day of *p*-coumaric acid) or metformin (50 mg/kg/day) on key enzymes in the synthesis and degradation of glycogen and on GLUT2 in sub-chronic study. Liver tissue lysates were obtained and processed by western blotting. **A)** Representative image of an immunoblot. **B)** Relative level by densitometry of glycogen synthase-2. **C)** Relative level by densitometry of glycogen phosphorylase (PYGB). **D)** Relative level by densitometry of GLUT2. Densitometry analysis of protein content was made in relation to actin, used as a loading control. Values are expressed as Mean±S.E.M. ($n=5$). *Significant difference against diabetic control (alloxan ISS). $p<0.05$.

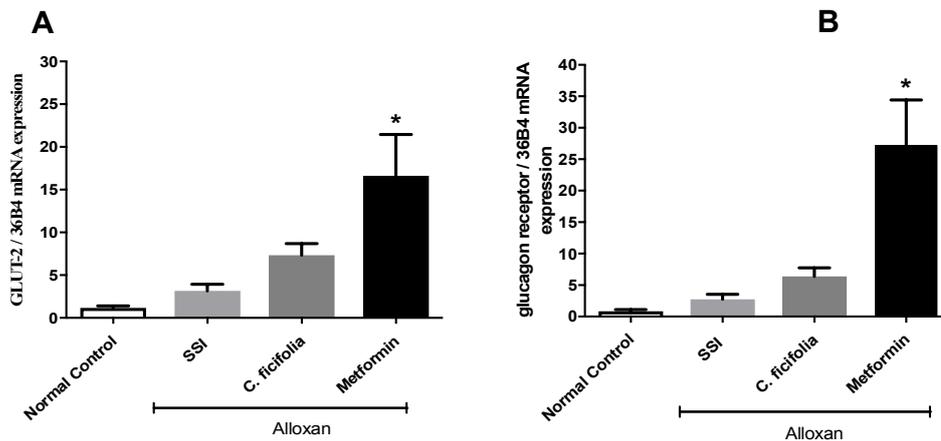


Figure 4: Effect of *C. ficifolia* extract (200 mg/kg/day, equivalent to 11.6 µg/kg/day of *p*-coumaric acid) or metformin (50 mg/kg/day) on mRNA expression of: **A)** GLUT-2; **B)** glucagon receptor, in liver tissues of normal control and alloxan-induced diabetic mice. Mean±S.E.M. ($n=5$). *Significant difference against diabetic control (Alloxan ISS). $p<0.05$.

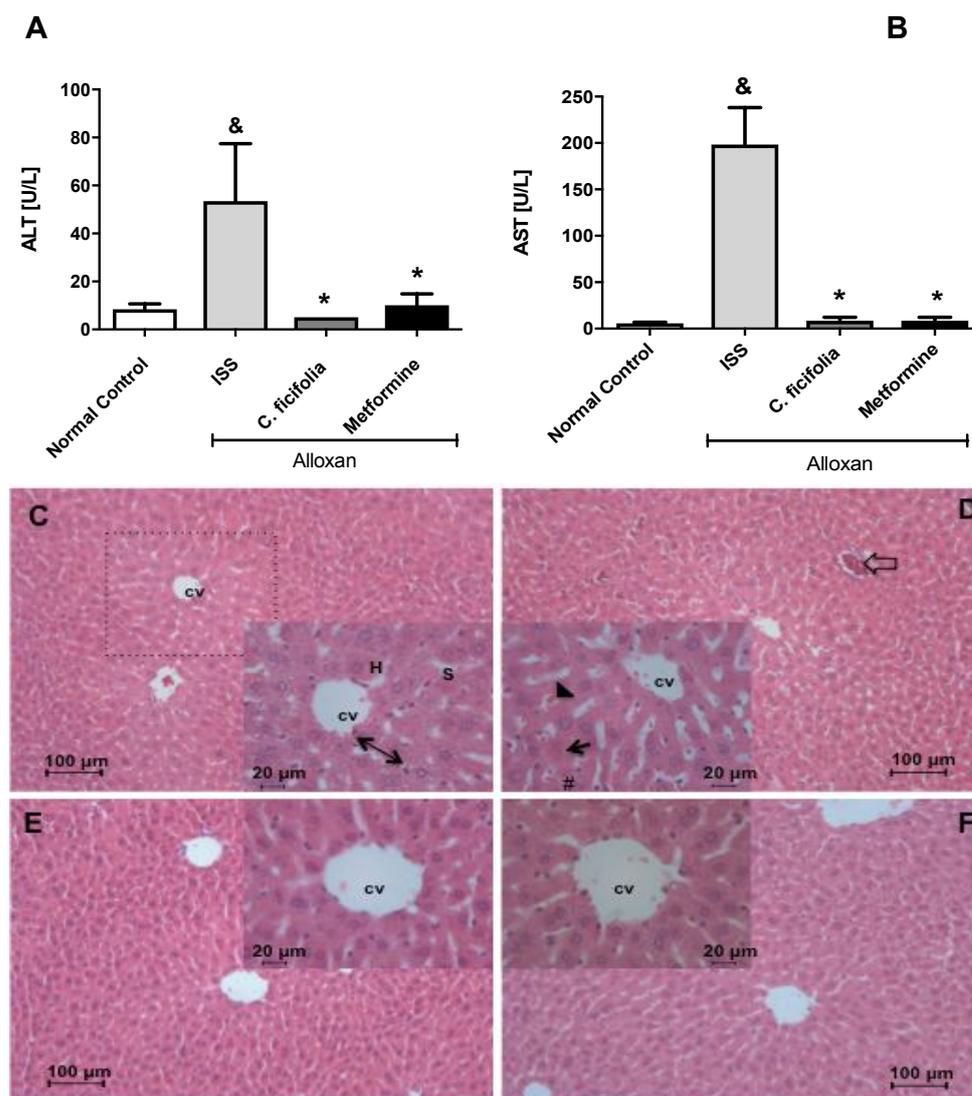


Figure 5: Effect of *C. ficifolia* extract (200 mg/kg/day, equivalent to 11.6 µg/kg/day of *p*-coumaric acid) or metformin (50 mg/kg/day) on liver enzymes content in sub-chronic study: **A)** ALT; **B)** AST. Mean±S.E.M. (*n*=5). [&]Significant difference against Normal control; ^{*}Significant difference against diabetic control (Alloxan ISS). *p*<0.05. **C-F)** Photomicrographs of liver transversal section: **C)** Control mice (ISS); **D)** Alloxan-diabetic mice treated with ISS; **E)** Alloxan-diabetic mice treated with *C. ficifolia*. **F)** Alloxan-diabetic mice treated with metformin. Hepatocyte (H), central vein (CV), hepatic cord (reversible arrow), sinusoid (S), hepatic lobule (dashed line), hyperemia (arrow head), vascular congestion (unfiled arrow), karyorrhexis (arrow) and hydropic degeneration (#). (H&E, original magnification main 100x and box 400x).

The results of the present study indicate that the *C. ficifolia* hypoglycemic effect might be due, at least in part, to an increased storage of glycogen in the liver, which was confirmed by PAS staining, like a consequence of increased glycogen synthase. This finding is similar to those of other Cucurbitaceae species with similar effects, such as *Cucurbita moschata*, which also increased muscle glycogen levels and improved the physical performance in mice (Wang et al., 2012). The response of a normal liver to a glucose load involves the sequential inactivation of glycogen phosphorylase and the activation of glycogen synthase, which is the rate-limiting enzyme in glycogen synthesis. In contrast, in alloxan-induced diabetes model, the liver response to glucose becomes deficient a few days after the administration of alloxan, with the impaired activation of glycogen synthase (Ou et al., 2012). Interestingly, in this study the administration of *C. ficifolia* extract increased the glycogen synthase levels and,

consequently, the liver glycogen of diabetic mice. High insulin levels promote the storage of glucose as glycogen in the liver through the dephosphorylation and activation of glycogen synthase. In fact, insulin exerts a rapid effect, causing increased glycogen synthase and consequently glycogen accumulation (Wilcox, 2005). In this study, we observed low levels of glucagon receptor in mice treated with *C. ficifolia*, decreased levels of glycogen phosphorylase and, in consequence, inhibition of glycogenolysis that resulted in decreased plasma glucose. Although these results do not permit directly determinate activation of glycogen synthesis or inhibition of glycogenolysis, the two changes result in increased liver glycogen, which clearly was evident with the PAS stain. On the other hand, GLUT2 expression did not change by the *C. ficifolia* extract, probably due to increased hepatic glycogen storage by the extract, which makes unnecessary the incorporation of liver glucose (Im et al., 2005).

Alloxan-induced diabetes may produce hepatotoxicity and necrosis (Sawants et al., 2006). In light of this, the hepatic functionality of diabetic mice treated with *C. ficifolia* by monitoring the levels of ALT and AST in serum was determined. Elevated levels of ALT are related to liver damage and disordered hepatocytes in type 2 diabetes patients, whereas the AST levels are maintained mainly by hepatic sinusoidal cells in the development of fibrosis, which leads to relative increases in serum AST (Judi et al., 2010). In the present study, alloxan-induced diabetic mice showed elevated levels of both enzymes. Histological analysis also showed disordered hepatocytes, loss of radial disposition of the hepatic lobules, increased sinusoidal space and extensive degeneration, as well as necrosis markers such as karyolysis and karyorrhexis, which are characteristics of an inflammatory condition. The opposite was observed in the group treated with *C. ficifolia* extract, which showed a radial arrangement of the hepatic lobules, no disordered hepatocytes, and no necrosis. The overall hepatic structure remained unaltered, showing a protective effect from the extract.

This effect could be because the *C. ficifolia* extract contains phytochemical compounds that offer protection against liver toxicity, or it could be due antioxidant and anti-inflammatory effects previously reported for *C. ficifolia*, that improves the redox state and modulates the GSH/GSSG ratio in liver, pancreas and kidney of diabetic mice and 3T3-L1 adipocytes (Fortis et al., 2013; Roman et al., 2012; Diaz et al., 2012). There are many antioxidant compounds reported in Cucurbitaceae, as vitamins, carotenoids and flavonoids, which function like scavengers or inductors to eliminate reactive oxygen substances, which may be useful in the treatment of various diseases (Diaz et al., 2012; Hancock et al., 2008; Azevedo and Rodriguez 2007; Pereira et al., 2009), cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides, which are now recognized for their anti-cancer activities. They also have a range of pharmacological effects both in vitro and in vivo, including anti-inflammatory, hepatoprotective, antimicrobial and anti-hyperglycemic effects (Chang et al., 2008; Wang et al., 2008).

Phenolic components such as *p*-hydroxybenzoic acid have been identified as antioxidants, which have a peroxy radical-scavenging ability that counteracts the damaging effects of reactive oxygen species and because of their anti-inflammatory effects and antimicrobial activity against a number of microorganisms (Manuja et al., 2013). The antioxidant activity reported for *p*-coumaric acid could help reduce oxidative stress and, consequently, the liver cellular damage (Pereira et al., 2009). In addition, it is likely that *p*-coumaric acid in the extract inhibits gluconeogenesis in the liver by inhibiting pyruvate transport into the mitochondria, as reported Lima et al. (2006).

Other of the major compounds of *C. ficifolia* extract, salicin, also could contribute to the liver-protective effect due its reported neuroprotective and anti-inflammatory activity. In fact, its hydroxyl groups can interact with cicloxygenase-2, causing the inhibition of this enzyme and subsequently deregulating inflammation (Passonneau and Lauderdale, 1974; Mahdi, 2014). In addition, two phytosterols, i.e., stigmast-7,22-dien-3-ol and stigmast-7-en-3-ol, were found in the aqueous *C. ficifolia* extract. These compounds have been also reported in pumpkin seeds from *Cucurbita pepo* L., which is often eaten as a snack and may prevent chronic diseases; it has also been reported to alleviate the signs of benign prostatic hyperplasia (Kim et al., 2012; Abdel 2006). It is likely that these compounds act either, alone or synergistically, to reduce blood glucose levels, which can reverse or reduce the damage caused by DM. *C. ficifolia* represents an alternative therapy for treatment and control of DM, with a hypoglycemic effect and liver-protective properties and with antioxidant and anti-inflammatory properties that could potentially help improve the control of DM and prevent the development of vascular complications while improving the quality of life for patients.

Conclusions

The hypoglycemic effect of a chemically characterized extract of *C. ficifolia*, caused hepatic glycogen storage without changes in liver function or normal liver architecture, showing a liver-protective effect in alloxan-induced diabetic mice. This extract represents an alternative therapy for DM patients with liver complications because it exhibits hypoglycemic and liver-protective effects, while also possessing antioxidant and anti-inflammatory properties. Phytochemical study permitted the identification of five majoritarian compounds: two phytosterols (stigmast-7,22-dien-3-ol and stigmast-7-en-3-ol), *p*-coumaric acid, *p*-hydroxybenzoic acid and salicin, which have reports of pharmacological activity. In further studies, should be determined if these compounds are the active principles.

Acknowledgements

The present study was supported by a grant from CONACyT to Jessica Garcia Gonzalez (with fellowship number 234251) as part of her PhD degree in Experimental Biology and PRODEP-SEP. The authors appreciate to the

References

1. Abdel, R. (2006). Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) diets on benign prostatic hyperplasia (BPH): chemical and morphometric evaluation in rats. *W. J. Chem.* 1: 33-40.
2. Acosta, J.L., Jimenez, B.E., Juarez, M.A. and Diaz, J.C. (2001). Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J. Ethnopharmacol.* 77: 99-101.
3. Alarcon, F.J., Hernandez, E., Campos, A.E., Xolalpa, S., Rivas, J.F., Vazquez, L.I. and Roman, R. (2002). Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 82: 185-189.
4. Almanza, J.C., Alarcon, F.J., Blancas, G., Campos, A.E., Roman, R., Garcia, R. and Cruz M. (2010). Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomed. Pharmacother.* 64: 534-540.
5. Azevedo, C.H. and Rodriguez, D.B. (2007). Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *J. Agr. Food Chem.* 55, 4027-4033.
6. Banderas, T.R., Roman, R., Zamilpa, A., Garcia, R., Diaz, M., Campos, G., Tortoriello, J. and Alarcon, F.J. (2012). Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (*Cucurbita ficifolia* Bouché and *Ibervillea sonorae* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings. *Bol. Latinoam. Car. Plant Med. Arom.* 11: 510-519.
7. Carroll, M.F., Izard, A., Riboni, K., Burge, M.R. and Schade, D.S. (2002). Control of postprandial hyperglycemia. *Diabetes Care* 25:2147-2152.
8. Chang, C.I., Chen, C.R., Liao, Y.W., Cheng, H.L., Chen, Y.C. and Chou, C.H. (2008). Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *J. Nat. Prod.* 71: 1327-1330.
9. Clavijo, D., Gutiérrez, M., Palestino, M., Dominguez, M., Nuño, N., Souza, V., Miranda, U., Kershenobich, D., Gutiérrez, M.C., Bucio, L. and Gomez, L.E. (2014). Acetaldehyde targets superoxide dismutase 2 in liver cancer cells inducing transient enzyme impairment and a rapid transcriptional recovery. *Food Chem. Toxicol.* 69: 102-108.
10. Diaz, M., Angeles, S., Baiza, L.A., Medina, R., Hernandez, D., Ortega, C., Roman, R., Cruz, M. and Alarcon, F.J. (2012). Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 144: 101-108.
11. Fortis, A., Alarcon, F.J., Banderas, T., Diaz, M., Roman, R., Cruz, M. and Garcia, R. (2013). *Cucurbita ficifolia* Bouche (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 65: 1563-1576.
12. Hancock, D., Chudek, A., Walker, G., Pont, D. and Viola, R. (2008). Ascorbic acid conjugates isolated from the phloem of Cucurbitaceae. *Phytochemistry* 69: 1850-1858.
13. Im, S.S., Kang, S.S., Kim, S.Y., Kim, H.I., Kim, J.W., Kim, K.S. and Ahn, Y.H. (2005). Glucose-stimulated upregulation of GLUT2 gene is mediated by sterol response element-binding protein-1c in the hepatocytes. *Diabetes* 54: 1684-1691.
14. Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A.L., Tsapas, A., Wender, R. and Matthews, D.R. (2012). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. *Diabetes Care* 35:1364-1379.
15. Jahan, N., Ahmed, W. and Malik, A. (1995). New steroidal glycosides from *Mimusops elengi*. *J. Nat. Prod.* 58: 1244-1247.
16. Judi, L., Toukan, A., Khandar, Y., Ajlouni, K. and Khatib, M.A. (2010). Prevalence of elevated hepatic transaminases among Jordanian patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann. Saudi Med.* 30: 25-32.
17. Krentz, A.J. and Bailey, C.J. (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 65: 385-411.
18. Kim, CS., Subedi, L., Park, K.J., Kim, SY., Choi, SU., Kim, KH. and Lee, KR. (2015). Salicin derivatives from *Salix glandulosa* and their biological activities. *Fitoterapia* 106: 147-152.
19. Kim, MY., Kim, EJ., Kim, YN., Choi, C. and Lee, BH. (2012). Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. *Nutr. Res. Pract.* 6: 21-27.
20. Lima, L.C., Buss, G.D., Ishii-Iwamoto, E.L., Salgueiro-Pagadigorria, C., Comar, J.F., Bracht, A. and Constantin, J. (2006). Metabolic effects of *p*-coumaric acid in the perfused rat liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20: 18-26.
21. Mahdi, J.G. (2014). Biosynthesis and metabolism of β -D-salicin: A novel molecule that exerts biological function in humans and plants. *Biotechnology Reports* 4: 73-79.
22. Manuja, R., Sachdeva, S., Jain, A. and Chaudhary, J. (2013). A comprehensive review on biological activities of *p*-hydroxybenzoic acid and its derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 22: 109-115.
23. Miranda, M.E., Escobar, M.C., Ortega, C., Sanchez, F., Almanza, J.C. and Alarcon, F.J. (2013). *Cucurbita ficifolia* Bouché fruit acts as an insulin secretagogue in RINm5F cells. *Int. Biotech. Color J.* 3: 8-14.
24. Ou, Y., Lin, L., Pan, Q., Yang, X. and Cheng, X. (2012). Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis*

doi:10.21010/ajtcam.v14i3.24

- on alloxan-injured mice. *Env. Toxicol. Pharma.* 34: 721-726.
25. Passonneau, V. and Lauderdale, R. (1974). A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Analyt. Biochem.* 60: 405-12.
 26. Pereira, D.M., Vaentao, P., Pereira, J.A. and Andrade, P.B. (2009). Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* 14: 2202-2211.
 27. Presnell, K. and Schreiberman, P. (1997). *Humason's Animal Tissue Techniques*, W.H. Freeman and Company (Eds.), USA, pp. 572.
 28. Pianaro, A., Pereira, P.A., Trevistan, F.D., Kazue, I.N. and Braz-Filho, R. (2007). Iridoid glucoside and antifungal phenolic compounds from *Spathodea campanulata* roots. *Semina: Ciencias Agrarias, Londrina* 28: 251-256.
 29. Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B. and Sobin, L.H. (1992). *Laboratory methods in histotechnology*, Washington: Armed Forces Institute of Pathology (Eds.), USA, pp. 151-154.
 30. Roman, R., Almanza, J.C., Fortis, A., Angeles, S., Banderas, T., Zamilpa, A., Diaz, M., Jasso I., Blancas, G., Gomez, J. and Alarcon, F.J. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouche in streptozotocin-induced diabetes mice. *Am. J. Chinese Med.* 40: 1-14.
 31. Sawants, P., Dnyanmote, V., Warbritton, A., Latendresse, R. and Mehendale, M. (2006). Type 2 diabetic rats are sensitive to thioacetamide hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211: 221-232.
 32. Seo, S., Uomori, A., Yoshimura, Y., Sankawa, U. and Ebizuka, Y. (1987). Stereospecificity in the side-chain formation of 24 β -ethylsterols in tissue cultures of *Trichosanthes kirilowii*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 24: 1876-1878.
 33. Wang, D.C., Xiang, H., Li, D., Gao, H.Y., Cai, H., Wu, L.J. and Deng, X.M. (2008). Purine-containing cucurbitane triterpenoids from *Cucurbita pepo* cv dayangua. *Phytochemistry* 69: 1434-1438.
 34. Wang, S.Y., Huang, W.C., Liu, C.C., Wang, M.F., Ho, C.S., Huang, W.P., Hou, C.C., Chuang, H.L. and Huang, C.C. (2012). Pumpkin (*Cucurbita moschata*) fruit extract improves physical fatigue and exercise performance in mice. *Molecules* 17: 11864-11876.
 35. Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev.* 26: 19-39.
 36. Xia, T. and Wang, Q. (2006a). Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Fitoterapia* 77: 530-533.
 37. Xia, T. and Wang, Q. (2006b). D-chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit plays the hypoglycaemic role in streptozotocin-diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 1527-1532.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00088

Matrícula: 2121800424

Caracterización química de *Cucurbita ficifolia* Bouché y su efecto hipoglucémico mediado por almacenamiento del glucógeno hepático

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 24 del mes de marzo del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE LUIS EDUARDO FLORES SAENZ
- DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
- DRA. MARGARITA DIAZ FLORES
- DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ



JESSICA GARCIA GONZALEZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JESSICA GARCIA GONZALEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. JOSE LUIS EDUARDO FLORES SAENZ

VOCAL

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DRA. MARGARITA DIAZ FLORES

SECRETARIO

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ