



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Efecto de *Cucurbita ficifolia* sobre el estrés oxidativo, inflamación y
activación de PKB en adipocitos 3T3-L1**

PRESENTA

M. en BIOL. EXP. MARÍA DE LOS ÁNGELES FORTIS BARRERA

COMITÉ TUTORAL

Codirectores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dra. Rebeca García Macedo

Asesor:

Dr. Miguel Cruz López

México, D.F., 29 de Noviembre de 2013

Comité tutorial

Co-director

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C

Dpto. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa

aaaf@xanum.uam.mx

Co-directora

Dra. Rebeca García Macedo

Investigadora asociado C

Investigadora de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS

gamareb@yahoo.es

Asesor

Dr. Miguel Cruz López

Investigador titular B

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS

mcruzl@yahoo.com

El programa de doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 309-0) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT PIFOP-CONACYT-SEP y cuenta con apoyo del mismo consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 212872 y de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS con número 9909442.

Se agradece a la Fundación IMSS A.C. y a la Fundación Río Arronte I.A.P. por el equipo de laboratorio donado a la UIM. Bioquímica, HE. CMNSXXI. IMSS. Este proyecto fue financiado en parte por la Coordinación de Investigación en salud a través del Fondo de Investigación en Salud del IMSS FIS/IMSS/PROT/MD11/1004].

“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: Efecto de *Cucurbita ficifolia* sobre el estrés oxidativo, inflamación y activación de PKB en adipocitos 3T3-L. Con fecha 29 de Noviembre de 2013.”

Dr. Julio César Almanza Pérez

Profesor titular C
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
julcesarmac2@yahoo.com.mx

Presidente



Dr. Miguel Cruz López

Investigador titular B
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS
mcruzl@yahoo.com

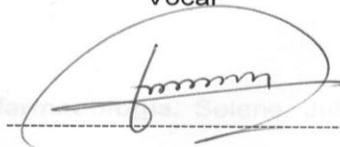
Secretario



Dra. Margarita Díaz Flores

Investigadora asociado C
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.
Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS
mardiaz2001@yahoo.com

Vocal



Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Profesor asociado C
Universidad Nacional Autónoma de México FES-Iztacala
dr.marcorodriguez@gmail.com

Vocal



Agradecimientos

A mi familia

Le agradezco a mi mamá, a mi papá y a mis hermanos Lidia, Daniel y Víctor, porque siempre estamos juntos en los malos y buenos momentos, por su cariño, apoyo, comprensión y su gran paciencia a lo largo de mi vida. Porque son mi motivación para seguir adelante en cada una de las metas que me propongo.

A la Dra. Rebeca y a la Dra. Margarita

Les agradezco por su gran apoyo en mi formación académica, por escucharme en cada momento que necesitaba su ayuda. Pero además por su amistad lo que hizo más agradable mi estancia en centro médico.

A mis tutores, el Dr. Alarcón y la Dra. Rebeca; y a mi asesor el Dr. Miguel. Por ayudarme y compartir sus conocimientos para mi formación científica.

A mis amigos y compañeros de laboratorio de farmacología. Selene, Julio, Gerardo, Gabriela, Tania, Iván, Jessica. Por la amistad que me han brindado y espero por siempre poder conservarla.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1 Estrés oxidativo	6
• 1.1.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	7
• 1.1.2 Antioxidantes enzimáticos	8
• 1.1.3 Antioxidantes no enzimáticos	10
• 1.1.4 Implicaciones del estrés oxidativo en la obesidad	12
1.2 Adipocinas en la resistencia a la insulina	14
• 1.2.1 TNF-α	16
• 1.2.2 IL-6	17
• 1.2.3 Resistina	18
• 1.2.4 Adiponectina	18
2. <i>Cucurbita ficifolia</i> y D-quirositol (DQI)	20
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivo general	25
5.1 Objetivos particulares	25

6. Material y métodos	27
6.1 Preparación del extracto acuoso de <i>Cucurbita ficifolia</i>	27
6.2 Cuantificación de DQI e identificación de compuestos antioxidantes en el extracto acuoso del fruto de <i>Cucurbita ficifolia</i>	27
6.3 Cultivo celular	29
6.4 Viabilidad celular	30
6.5 Relación de GSH/GSSG	30
6.6 Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) intracelular	31
6.7 Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR)	32
6.8 Expresión del RNAm de las citocinas por RT-PCR tiempo real	33
6.9 Determinación de las citocinas por el método de ELISA	35
6.10 Análisis de la activación de PKB por Western blot	35
6.11 Análisis estadístico	37
7. Resultados	38
7.1 Cuantificación de DQI e identificación de compuestos antioxidantes en el extracto acuoso del fruto de <i>Cucurbita ficifolia</i>	38
7.2 Viabilidad de las células 3T3-L1 tratadas con <i>Cucurbita ficifolia</i> o con DQI	40
7.3 Efecto de <i>Cucurbita ficifolia</i> y DQI sobre el estrés oxidativo	42

7.4 Efecto de <i>Cucurbita ficifolia</i> y el DQI sobre la expresión de adipocinas	49
7.5 Efecto de <i>Cucurbita ficifolia</i> y DQI sobre la activación de PKB	62
8. Discusión	63
9. Conclusiones	69
10. Perspectivas	70
11. Esquema de las conclusiones y perspectivas del extracto de <i>Cucurbita ficifolia</i> y DQI	71
12. Bibliografía	73
13. Anexo	90

Resumen

Cucurbita ficifolia Bouché es una planta que se cultiva en México por sus frutos comestibles, a los cuales se les ha atribuido potencial terapéutico en el control de la diabetes. Un extracto acuoso de este fruto se ha reportado como hipoglucemiante, antioxidante y antiinflamatorio *in vivo*. Este extracto contiene D-quirositol (DQI) como el componente principal, pero aún no es clara su participación en los efectos biológicos mencionados. En el presente trabajo se investigó el efecto del extracto acuoso (estandarizado con base en su contenido de DQI) y del DQI sintético sobre parámetros de estrés oxidativo e inflamación, dos anormalidades presentes en obesidad y diabetes tipo 2 (DT2), así como en la activación de la proteína cinasa B (PKB), en adipocitos 3T3-L1. Los tratamientos con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y el DQI sintético, disminuyeron la relación GSH/GSSG y H_2O_2 , y aumentaron la actividad de la glutatión peroxidasa. Además, DQI disminuyó la expresión del RNAm y la proteína de TNF- α , IL-6 y resistina, mientras *Cucurbita ficifolia* disminuyó resistina e incrementó IL-6. Y ambos tratamientos no modificaron los niveles de adiponectina. Por otra parte, el DQI activó PKB en ausencia de insulina como evidencia de su efecto insulinomimético, contrario a lo observado con el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*. Por lo tanto, el efecto antioxidante y antiinflamatorio del extracto de *Cucurbita ficifolia* puede deberse, en parte, a su contenido de DQI. Debido a que incrementó la actividad de la glutatión peroxidasa, la cual participa en la regulación del estado redox (GSH/GSSG) con disminución del H_2O_2 , evitando la activación de la vía inflamatoria. Ambos tratamientos pueden reducir los daños causados por el estrés

oxidativo en obesidad y DT2. El efecto antiinflamatorio del DQI, conjuntamente con su efecto insulinomimético, podrían coadyuvar al tratamiento de estas dos patologías.

Abstract

Cucurbita ficifolia Bouché is a cultivated plant in Mexico due to its edible fruits, which have been reputed with anti-diabetic properties. Previously, it was reported that an aqueous extract of this fruit, containing D-chiro-inositol (DCI), has hypoglycaemic, antioxidant and anti-inflammatory effects, as shown in *in vivo* studies. Although DCI has been reported like the principal component of this extract, it is yet unclear the participation of the DCI in these biological effects. In this study, we investigated and compared the effects of the extract (characterised by its DCI content) and the synthetic DCI on oxidative stress and inflammation. These processes are altered in individuals with obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes (T2D). Additionally, we evaluated the protein kinase B (PKB) activation in 3T3-L1 adipocytes. Adipocytes treated with *Cucurbita ficifolia* extract and with synthetic DCI reduced oxidative stress, as demonstrated by decreased H₂O₂ levels, increased glutathione peroxidase activity and changes in the GSH/GSSG ratio. Furthermore, DCI decreased the mRNA expression and secretion of TNF- α , IL-6 and resistin, while *Cucurbita ficifolia* reduced protein levels of resistin and increased IL-6 levels. But both treatments do not modify adiponectin levels. Only DCI demonstrated insulin-mimetic action. The antioxidant and anti-inflammatory effects of *Cucurbita ficifolia* extract can be explained in part by its DCI content, which modulates the GSH/GSSG ratio and contributes to a reduced pro-inflammatory state. *Cucurbita ficifolia* and DCI treatments may reduce the disturbances caused by oxidative stress in obesity and T2D. The anti-inflammatory

effect of DCI in conjunction with its insulin-mimetic effect may be a coadjutant in treatment of these pathologies.

1. Introducción

La obesidad y el sobrepeso son dos problemas de salud pública creciente a nivel mundial y nacional que demandan ser atendidos oportunamente. Se pueden definir como una condición crónica de origen multifactorial prevenible, caracterizada por acumulación anormal o excesiva de grasa e hipertrofia del tejido graso del organismo, que es nociva para la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone que el índice de masa corporal (IMC) para diagnosticar sobrepeso debe ser igual o superior a 25 Kg/m² y, en obesidad, igual o superior a 30 Kg/m² (OMS, 2013).

En México el incremento del sobrepeso y obesidad es alarmante; en la población infantil el incremento es más preocupante ya que la prevalencia en niños menores de cinco años ha registrado un ligero ascenso a lo largo del tiempo, de 1988 a 2012 de 7.8% a 9.7%, respectivamente. La prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad en 2012 fue de 34.4% (19.8 y 14.6%, respectivamente); lo que representa en niños en edad escolar alrededor de 5,664,870 niños con sobrepeso y obesidad. Además, 35% de los adolescentes presentan sobrepeso u obesidad. En el ámbito nacional esto representa alrededor de 6,325,131 individuos entre 12 y 19 años de edad. En los adultos, la prevalencia combinada de sobrepeso u obesidad es mayor en las mujeres (73%) que en los hombres (69.4%) (Gutierrez *et al.*, 2012).

En la obesidad el exceso de tejido adiposo promueve alteraciones del estado redox celular y un estado pro-inflamatorio (Galinier *et al.*, 2006; Fresno *et al.*,

2011). Ambas alteraciones pueden propiciar el desarrollo de resistencia a la insulina (Torres-Leal *et al.*, 2010) debido a que favorecen cambios en la fosforilación de proteínas que intervienen en la transducción de señales de insulina, como es el caso del sustrato del receptor de insulina (IRS) (Fernández-Veledo *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2002) y de la proteína cinasa B (PKB) (Tirosh *et al.*, 1999). A su vez, la resistencia a la insulina es factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DT2), síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares e hipertensión, entre otras (Torres-Leal *et al.*, 2010). Por lo tanto, el estado redox celular y la inflamación sistémica son factores importantes en la fisiopatología de la obesidad y la DT2.

1.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es resultado del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o decremento en la defensa antioxidante, que conduce al daño de biomoléculas, tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Trevisan *et al.*, 2001; Brieger *et al.*, 2012). Las ERO pueden ser moléculas neutras, iones o radicales derivados del oxígeno, como son: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), los singuletes delta y sigma de oxígeno (1O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Brieger *et al.*, 2012).

1.1.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

El $O_2^{\cdot-}$ se forma cuando el oxígeno capta un electrón (Nordberg y Arner, 2001). Alrededor del 98% de oxígeno se metaboliza en las mitocondrias, donde se transfieren electrones al oxígeno para producir moléculas de agua (H_2O). Si el oxígeno no recibe adecuadamente los electrones, el resultado es la producción del $O_2^{\cdot-}$. Se han identificado en la cadena de transporte de electrones en dos sitios, el complejo I y ubisemiquinona, donde los electrones pueden transferirse a moléculas de oxígeno llevando a la formación de $O_2^{\cdot-}$ (McCord, 2008). Además de la mitocondria, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear también pueden generar $O_2^{\cdot-}$. Algunas oxidasas como la oxidasa de xantina, NADPH oxidasa y algunas enzimas como la lipoxigenasa y ciclooxigenasa producen $O_2^{\cdot-}$. Por otra parte, el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con otras moléculas, como el óxido nítrico, generando peroxinitrito ($ONOO^-$), compuesto más oxidante que el óxido nítrico (Nordberg y Arner, 2001).

El H_2O_2 no es un radical libre; sin embargo, tiene gran importancia por su habilidad de penetrar a las membranas biológicas. La mayor parte del H_2O_2 proviene de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ y participa como intermediario en la producción de otras ERO, incluyendo el ácido hipocloroso ($HOCl$) por acción de la mieloperoxidasas y formación del radical $\cdot OH$ (Hansberg, 2002; Nordberg y Arner, 2001). Así, cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado; ya sea de un metal de transición como Fe^{2+} o Cu^+ , se fragmenta y forma el radical $\cdot OH$ y el ión hidroxilo HO^- (reacción de Fenton). Este último es inocuo y se protona para formar

H₂O (Figura 1); en cambio, el •OH es uno de los radicales más reactivos que existen (Hansberg, 2002).

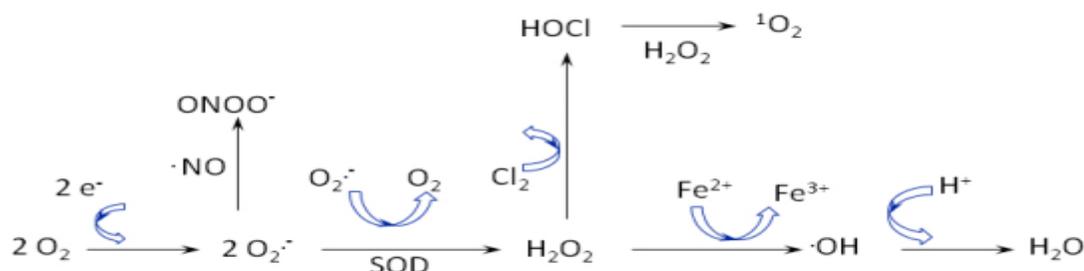


Figura 1. Formación de especies reactivas de oxígeno. El anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) es una molécula muy inestable; por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) es transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2); esta molécula por reacción de Fenton puede producir el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). En caso de que el $\text{O}_2^{\bullet -}$ reaccione con el óxido nítrico (NO) se forma el peroxinitrito (ONOO^-). El singlete de oxígeno (${}^1\text{O}_2$) se forma en la reacción del ácido hipocloroso (HOCl) con el H_2O_2 (Brieger *et al.*, 2012).

1.1.2 Antioxidantes enzimáticos.

Los sistemas antioxidantes se dividen en dos principales grupos: enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y catalasa) y no enzimáticos (glutatión, vitaminas C y E, carotenos y flavonoides) (Flora, 2009).

La SOD es la enzima que dismuta al anión $\text{O}_2^{\bullet -}$, formando H_2O_2 y oxígeno (McCrod, 2008). Existen diferentes isoformas de SOD en las células eucariotas; en mitocondria se encuentra la SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD) y en

citósol la dependiente de cobre/zinc (Cu/Zn-SOD). En mitocondria el $O_2^{\cdot-}$ es producido en altas concentraciones por la cadena respiratoria, por lo cual la presencia de Mn-SOD es esencial (Nordberg y Arner, 2001).

La catalasa es una enzima localizada principalmente en los peroxisomas de los mamíferos, donde la catalasa dismuta al H_2O_2 formando H_2O y O_2 . La catalasa además tienen la función de metabolizar diferentes substratos, como fenoles y alcoholes, por la vía acoplada a la reducción del H_2O_2 (Nordberg y Arner, 2001).

La enzima GPX se presenta en cuatro isoformas en los mamíferos, todas con una seleno-cisteína. Esta enzima cataliza la reducción del H_2O_2 o lipoperóxido (L-OOH), utilizando como substrato al glutatión reducido (GSH) (Nordberg y Arner, 2001), que a su vez es transformado a su forma oxidada (GSSG). Una vez que la GPX oxida al GSH, la enzima GR reduce al GSSG a través de $NADPH+H^+$ (Figura 2) (Lu, 2009; Kobayashi *et al.*, 2009).



Figura 2. Vía redox del glutatión. La enzima glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR) inactivan al H_2O_2 y lipoperóxidos, a través del GSH.

1.1.3 Antioxidantes no enzimáticos

La forma reducida del glutatión (GSH) es el antioxidante intracelular más abundante (Nordberg y Arner, 2001). En células eucariontes el 90% del GSH se encuentra en el citosol, el 10% en mitocondria y en menor porcentaje en retículo endoplásmico. El GSH tiene diferentes funciones, que incluyen: 1) desintoxicación de electrófilos, 2) reacciona con radicales libres, 3) mantiene los grupos tiol de las proteínas, 4) es reservorio de cisteína, 5) modula diversos procesos celulares (síntesis de DNA y funciones inmunes) (Lu, 2009). En la función antioxidante del GSH intervienen dos enzimas para mantener el equilibrio redox. El GSH a través de la GPX reduce los peróxidos y como resultado de esto el GSH se oxida a GSSG, que es nuevamente reducido a GSH por la GR, a expensas del $\text{NADPH}+\text{H}^+$, manteniendo la concentración del GSH (Nordberg y Arner, 2001; Kobayashi *et al.*, 2009). Por lo anterior, el cociente GSH/GSSG frecuentemente es considerado como un indicador del estado redox celular, así como un parámetro que mide la capacidad antioxidante de diferentes agentes (Griffith, 1999).

La vitamina C o ácido ascórbico, se considera un agente reductor; reacciona con radicales libre por medio de procesos de óxido-reducción. Una función importante de esta vitamina es regular el estado redox en la mitocondria y el retículo endoplásmico (Mandl *et al.*, 2009). El ácido ascórbico, al reducirse, se transforma

en su forma oxidada, el L-dehidroascorbato, el cual se puede reducir a L-ascorbato por medio del GSH (Flora, 2009; Mandl *et al.*, 2009).

Por otra parte, los compuestos fenólicos, metabolitos comunes de las plantas (más de 8,000), se caracterizan por tener por lo menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Cartea *et al.*, 2010). Se pueden clasificar en función del número y la disposición de sus átomos de carbono como flavonoides y no flavonoides (Cartea *et al.*, 2010; Jurikova *et al.*, 2011). Estos compuestos tienen función antioxidante al reaccionar con los radicales libres (Flora, 2009). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se relaciona con su estructura química, que les confiere propiedades redox debido al número y posición de los grupos hidroxilo en la molécula; un aumento en el número de grupos hidroxilo conduce a una mayor actividad antioxidante (Cartea *et al.*, 2010).

La nicotinamida es la forma amida de la vitamina B3, es precursor de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). La NAD⁺, junto con su forma reducida (NADH), están implicadas en reacciones de óxido-reducción, su función principal es la producción de energía en la célula. Además, la nicotinamida es esencial para la formación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺). El NADP⁺ y su forma reducida (NADPH⁺) intervienen en diferentes funciones celulares y en la protección antioxidante para la disminución de las ERO (Maiese *et al.*, 2009; Sauve, 2008).

1.1.4 Implicaciones del estrés oxidativo en la obesidad

En la obesidad, tanto los niveles elevados de lípidos como la hiperglucemia están relacionados con la disfunción de la mitocondria y generación de ERO (Park *et al.*, 2006). Los ácidos grasos libres pueden participar en la producción de ERO a través de la activación de NADPH oxidasa y xantina oxidasa. También se ha reportado que los niveles altos de ácidos grasos crónicamente conducen a la disfunción de la mitocondria, con un incremento de ERO y la acumulación de ácidos grasos al interior de la mitocondria (Martins *et al.*, 2012). Mientras que la hiperglucemia crónica permite un incremento de la glucólisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, efecto que provoca incremento en el flujo de electrones por los donadores de electrones (NADH y FADH₂) en la mitocondria; consecuentemente se incrementa la relación ATP/ADP con hiperpolarización de la membrana, que inhibe el transporte de electrones en el complejo III, conduciendo a la formación de O₂^{•-} (Rolo y Palmeira, 2006; Naudi *et al.*, 2012). Además, durante la hiperglucemia se activa la vía de los polioles. En ella, la glucosa es transformada en sorbitol por acción de la aldosa reductasa, que requiere como coenzima a la NADPH, lo cual disminuye la disponibilidad de esta molécula con repercusión en la actividad de las enzimas antioxidantes, como la GR (Naudi *et al.*, 2012).

Por lo tanto, una de las principales manifestaciones clínicas en la obesidad es el estrés oxidativo. Además, el IMC está asociado directamente con los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), considerado un marcador de

daño a lípidos por estrés oxidativo y está inversamente relacionado con la expresión de la GPX (Trevisan *et al.*, 2001). Se ha reportado que durante la hipertrofia del tejido adiposo se incrementa la expresión del RNAm de las subunidades de la NADPH oxidasa, decreciendo el RNAm y la actividad de las enzimas antioxidantes, como GPX, superóxido dismutasa (Cu/Zn) y catalasa. El tejido adiposo de ratones *ob/ob* y células de adipocitos 3T3-L1 incubados con H_2O_2 incrementan los niveles de GSH debido a la baja actividad de la GPX, afectando el balance GSH/GSSG. Todas estas alteraciones modifican el estado redox de la célula (Galiniér *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009).

En la obesidad el estrés oxidativo se asocia con la generación de inflamación, resistencia a la insulina y daño cardiovascular. Las ERO pueden regular la activación de cinasas sensibles al estrés oxidativo, como IKK- β , que a su vez activa al factor de transcripción NF- κ B (Evans *et al.*, 2005) promoviendo la expresión de varias citocinas proinflamatorias en células del sistema inmune, así como en los adipocitos, lo cual produce un estado inflamatorio crónico durante la obesidad (Esposito *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005). Además, el H_2O_2 producido por los adipocitos causa disminución en la fosforilación de IRS-1 e IRS-2 (Evans *et al.*, 2005). Se ha propuesto que el H_2O_2 produce un cambio en la localización de IRS-1 y PI3K en el citosol, evitando la activación de PKB (Tirosh *et al.*, 1999). Por otra parte, la administración de α -tocoferol, vitamina B y C (antioxidantes) a sujetos obesos reduce la inflamación sistémica determinada por los niveles del

factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la proteína cinasa C (PKC) (Gariballa *et al.*, 2013).

El estrés oxidativo es un factor importante para activar la vía de señalización inflamatoria y, en consecuencia, inducir resistencia a la insulina. En adipocitos 3T3-L1 incubados en presencia de una alta concentración de glucosa (25 mM) se propicia el incremento sobre el estrés oxidativo asociado con incremento en los niveles de resistina (citocina inflamatorias), comparado con las células incubadas con glucosa 5 mM, las cuales presentaron además disminución en la incorporación de glucosa (Lee *et al.*, 2008). Por lo tanto, en el adipocito el estrés oxidativo es un factor importante para activar la secreción de las citocinas inflamatorias y estas adipocinas consecutivamente pueden contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina y DT2.

1.2 Adipocinas en la resistencia a la insulina

El tejido adiposo tiene funciones importantes en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, además de que secreta diferentes factores con efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos (Torres-Leal *et al.*, 2010). En un individuo obeso el tejido adiposo blanco puede representar cerca del 50% del total de la masa corporal (IMC \geq 30 Kg/m²). El exceso de tejido adiposo blanco genera una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, debido a que este tejido incrementa la secreción de moléculas inflamatorias, como leptina, TNF- α , interleucina (IL) 6 y resistina, con una disminución en la secreción de adiponectina, citocina con acción

antiinflamatoria (Fresno *et al.*, 2011). Estas adipocinas en la obesidad pueden desencadenar defectos en la transducción de señales de la insulina.

Una de las funciones principales de la insulina es mantener la homeostasis de la glucosa. La hormona, al unirse a su receptor, activa dos principales vías de transducción: la vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). En la vía del PI3K, cuando el receptor de insulina es activado, interacciona con IRS-1. Esta proteína regula la activación de PI3K a través de los dominios SH₂; esta cinasa, localizada cerca de la membrana plasmática, tiene acceso a los sustratos fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4-P) y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI4,5-P₂), los cuales son fosforilados en la posición 3 del inositol, generando los productos PI3,4-bisfosfato (PIP₂) y PI3,4,5- trisfosfato (PIP₃). El PIP₃ sirve como sitio de unión para cinasas como PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositidos-1) y PKB.

La PKB es una cinasa serina/treonina que regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una lista creciente de sustratos que propagan la respuesta de la insulina, incluyendo translocación del transportador de glucosa (GLUT 4) a la membrana para la incorporación de glucosa, así como la regulación de diferentes enzimas: la glucógeno sintasa (GS), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la fosfofructocinasa 2 (PFK2), entre otras (Olivares y Arellano, 2008; Choi y Kim, 2010). Así, en la resistencia a la insulina disminuye la captación de la glucosa y la glucogénesis, aumentando la gluconeogénesis y la glucogenolisis, efectos que conducen a la

hiperglucemia (Van Cromphaut, 2009). En la obesidad, la inflamación sistémica de bajo grado es factor desencadenante de resistencia a la insulina, ya que ciertas citocinas alteran componentes de la vía de señalización de la insulina.

1.2.1 TNF- α

El TNF- α fue la primera citocina que se relacionó con la resistencia a la insulina en la obesidad. En pacientes obesos las concentraciones séricas de TNF- α son elevadas (Torres-Leal *et al.*, 2010) y en tejido adiposo de animales obesos (ratas fa/fa y ratones ob/ob) la expresión del RNAm de TNF- α se encuentra elevada (Hotamisligil *et al.*, 1993). El TNF- α presenta propiedades antagónicas a la insulina, ya que anticipa la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina o treonina, disminuyendo la fosforilación de los residuos de tirosina (Coppack, 2001). Esta citocina induce la fosforilación de IRS mediado por la PKC y la proteína cinasa IKK- β reguladora del NF- κ B. *In vivo*, el aumento de la actividad de IKK- β produce la fosforilación de IRS en el residuo de serina-307, mientras que dos isoformas de PKC, (PKC δ y PKC θ) pueden producir la fosforilación de serina/treonina, causando resistencia a la insulina (Evans, 2007; Steinberg, 2007). En tejido adiposo, TNF- α reduce la expresión y actividad de PPAR- γ , lipoprotein lipasa y GLUT4 disminuyendo la captación de glucosa y el almacenamiento de lípidos (Torres-Leal *et al.*, 2010). El bloqueo en la señalización intracelular de insulina inducido por el TNF- α se traduce en inhibición de las enzimas involucradas en la captación de ácidos grasos, en la captación de glucosa y en la síntesis de

triglicéridos, causando hiperglucemia e incremento en la concentración de ácidos grasos libres en sangre (Mendivil y Sierra, 2005).

1.2.2 IL-6

La IL-6 es una citocina pleiotrópica con acción proinflamatoria y antiinflamatoria. En el tejido adiposo de humanos y de animales obesos la expresión del RNAm de IL-6 se encuentra elevada. Esta citocina causa resistencia a la insulina por defectos en la fosforilación de IRS-1 asociado con la actividad de PI3K (Tataranni y Ortega, 2005). Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que al unirse IL-6 a sus dos tipos de receptores, gp130 e IL-6R α (Kristiansen y Mandrup-Poulsen, 2005) se produce la activación del factor de transcripción llamado traductor de señales y activador de transcripción-3 (STAT-3), que provoca la expresión de la proteína supresora de la señalización por citocinas (SOCS-3), factor que inhibe la autofosforilación del receptor de insulina y la fosforilación de IRS-1 e IRS-2; además regula negativamente la transcripción de IRS-1 (Emanuelli *et al.*, 2000; Senn *et al.*, 2003; Tores-Leal *et al.*, 2010). Por lo tanto, en adipocitos los niveles elevados de IL-6 disminuyen la captación de glucosa (Torres-Leal *et al.*, 2010; Fresno *et al.*, 2011). Alterno a esto, se ha demostrado que IL-6 es una adipocina con efecto lipolíticos, por lo cual la deficiencia de IL-6 en ratones conduce al desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina. Estas alteraciones pueden ser reversibles por la administración de IL-6. Se ha sugerido por estudios *in vitro* que los efectos de IL-6 sobre el metabolismo de los lípidos es a través de la activación AMPK (Wolsk *et al.*, 2010).

1.2.3 Resistina

En modelos animales obesos con resistencia a la insulina se encuentran niveles elevados de resistina en tejido adiposo y suero (Haluzik *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2006). La resistina es una citocina involucrada en la adipogénesis y en adipocitos 3T3-L1 la sobreexpresión de esta citocina disminuye el RNAm de PPAR- γ y de C/EBP α , factores de transcripción que regulan la diferenciación celular, lo cual también contribuye a defectos en la captación de glucosa (Fu *et al.* 2006). Los efectos antagónicos de la resistina con respecto a la insulina son: reducción del transporte de glucosa dependiente de insulina, aumento en la producción hepática de glucosa y aumento de la glucemia en ayunas (Schinner *et al.*, 2005). En células hepáticas de la línea HepG2 la resistina induce resistencia a la insulina a través de la expresión de SOCS-3, con reducción en la fosforilación de la PKB, así como al incrementar la expresión de enzimas gluconeogénicas (Luo *et al.*, 2009). Recientemente se ha propuesto que el mecanismo por el cual la resistina genera resistencia a la insulina es a través de la activación directa de los receptores tipo Toll; la unión de resistina a este receptor involucra la activación de moléculas inflamatorias (TNF- α e IL-6), las cuales tienen implicaciones en la resistencia a la insulina (Tarkowski *et al.*, 2010).

1.2.4 Adiponectina

La adiponectina es una citocina antiinflamatoria sintetizada específicamente por el adipocito. En modelos animales con obesidad se presentan niveles bajos de adiponectina; en humanos se correlaciona negativamente con adiposidad,

resistencia a la insulina, DT2 y síndrome metabólico. Esta adipocina mejora la sensibilidad a la insulina, reduce la producción hepática de glucosa y estimula la β -oxidación de ácidos grasos en hígado (Schinner *et al.*, 2005; Bastard *et al.*, 2006). Se propone que el mecanismo molecular de adiponectina para la regulación del metabolismo de glucosa y para disminuir la resistencia a la insulina está dado por la activación de AMPK y se ha observado que con el bloqueo de AMPK se inhiben estos efectos. La adiponectina, al favorecer el incremento de la oxidación de los ácidos grasos, disminuye el contenido de triglicéridos en hígado y músculo esquelético incrementando la sensibilidad a la insulina (Kadowaki *et al.*, 2006).

Debido a las implicaciones que tiene el estrés oxidativo y la inflamación en la obesidad (Figura 3) es importante el estudio de nuevos tratamientos para disminuir o prevenir ambas alteraciones, con el propósito de evitar el desarrollo de resistencia a la insulina, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y DT2. Las plantas podrían ser una alternativa interesante para la búsqueda de compuestos que presenten efecto antioxidante y/o antiinflamatorio, debido a la gran cantidad de compuestos que contienen (alcaloides, carbohidratos, terpenos, flavonoides, etc.) (Agrade-Cetto y Heinrich, 2005).

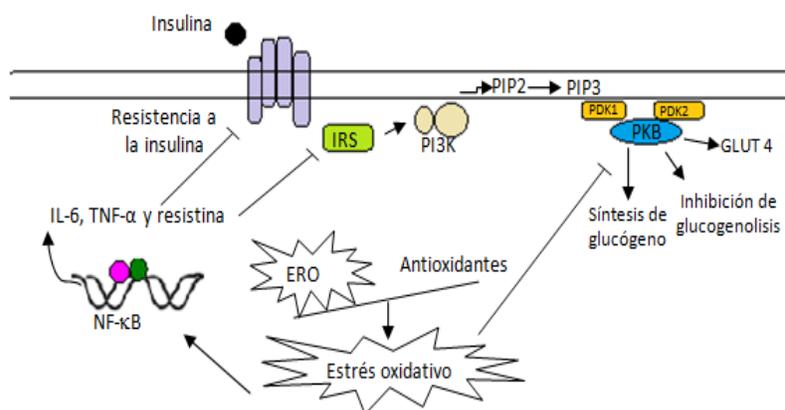


Figura 3. Implicaciones del estrés oxidativo e inflamación en resistencia a la insulina en adipocito. El incremento de las ERO con la disminución de los antioxidantes intracelulares puede afectar la señalización de la insulina, afectando las cinasas involucradas en la señalización de la insulina. Aunque también el estrés oxidativo es capaz de activar al factor de transcripción NF-κB, que promueve la expresión de citocinas inflamatorias y el desarrollo de resistencia a la insulina por diferentes mecanismos.

2. *Cucurbita ficifolia* y D-quirositol (DQI)

La planta de *Cucurbita ficifolia* Bouché (*Cucurbitaceae*) se utiliza en la medicina tradicional mexicana para el control de la DT2 (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). El fruto de *Cucurbita ficifolia* ha mostrado efecto hipoglucémico en diferentes condiciones experimentales (Roman *et al.*, 1992; Alarcon *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2001) y recientemente se demostró que disminuye el estrés oxidativo (Roman-Ramos *et al.*, 2012; Díaz-Flores *et al.*, 2012) y la inflamación (Fortis-Barrera, 2009) en modelos *in vivo*.

El efecto hipoglucemiante del fruto de *Cucurbita ficifolia* se ha demostrado en animales con diabetes experimental (Roman *et al.*, 1992; Alarcon *et al.*, 2002) y en pacientes con DT2 (Acosta *et al.*, 2001). El efecto hipoglucémico se ha asociado a su contenido de DQI, molécula que mostró efecto hipoglucémico en ratas tratadas con estreptozotocina, al incrementar los niveles de glucógeno hepático, la hemoglobina total y los niveles de insulina (Xia y Wang, 2006). Sin embargo todavía faltan por explorar otros efectos que pueda tener la molécula de DQI, así como sus efectos en el extracto de *Cucurbita ficifolia*, además del efecto hipoglucémico.

Por otra parte, también se observó que el extracto de *Cucurbita ficifolia* presenta efecto antioxidante en ratones con diabetes experimental debido al incremento de GSH y a la disminución de TBARS en diferente tejidos (hígado, corazón, riñón y páncreas) y en plasma (Roman-Ramos *et al.*, 2012; Díaz-Flores *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que su efecto antioxidante puede ser debido a componentes presentes en el extracto, tales como vitaminas, carotenoides o flavonoides (Díaz-Flores *et al.*, 2012). También se ha determinado que el extracto de *Cucurbita ficifolia* tiene un efecto antiinflamatorio en ratones obesos. Además, en estos animales a partir de una curva de tolerancia a la insulina se observó que disminuye la resistencia a la insulina (Fortis-Barrera, 2009). Por lo cual, la disminución de la inflamación podría estar asociada con la disminución en la resistencia a la insulina.

Aunque se conoce que *Cucurbita ficifolia* es capaz de disminuir la hiperglucemia, la inflamación, el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina *in vivo*, aún no se conocen las moléculas responsables y los mecanismos implicados en dichos efectos. El DQI es la molécula que se propone como responsable del efecto hipoglucemiante, sin embargo todavía faltan por explorar otros efectos que pueda tener esta molécula en el extracto de *Cucurbita ficifolia*.

El DQI es una molécula que pertenece a la familia de los inositoles. Existen nueve estereoisómeros de los inositoles, incluyendo: myo-, cis-, allo-, epi-, muco-, neo-, scyllo- y los isómeros ópticos L y D-quirositol. Son un grupo químicamente variable con propiedades polares y versátiles (Larner, 2002; Michell, 2008). Los inositoles (Figura 4) son compuestos que se han utilizado para el tratamiento de obesidad y DT2 (Larner 2002; Kawa *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que el DQI decrece los niveles de ERO en células endoteliales en condiciones de hiperglucemia (Nascimento *et al.*, 2006) y parece tener un efecto antiinflamatorio al prevenir el daño neuronal en ratas tratadas con estreptozotocina (Farias *et al.*, 2011); mientras la forma monometilada de DQI (el pinitol) presenta actividad antiinflamatoria, debido a que inhibe la activación de NF- κ B con la supresión de la respuesta inflamatoria (Sethi *et al.*, 2008). Además, el DQI forma parte de la estructura de los inositol fosfoglicanos, importantes mediadores de la acción de la insulina (Kawa *et al.*, 2003) participando en la activación de las enzimas glucógeno sintasa y piruvato deshidrogenasa (Larner *et al.*, 2010). Por lo tanto, el déficit de DQI en ratones obesos db/bd (Kawa *et al.*, 2003), en monos *Rhesus* y en personas

con DT2, conduce al desarrollo de resistencia a insulina (Larner, 2002; Larner *et al.*, 2010).

Por lo tanto, estas evidencias acerca de la actividad del DQI sobre el estrés oxidativo, inflamación y resistencia a la insulina, abren nuevas expectativas para el estudio del extracto de *Cucurbita ficifolia* y el DQI, y su utilidad en el control de la obesidad y la diabetes.

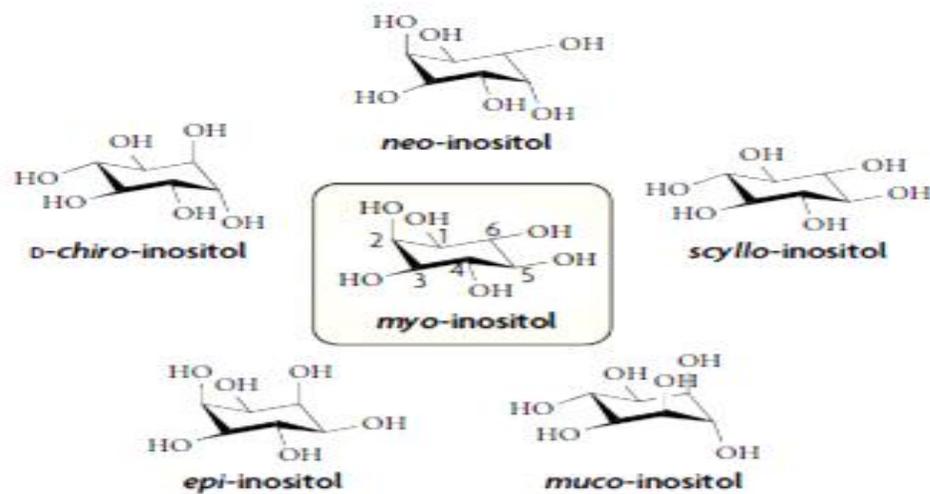


Figura 4. Inositales. Los inositales son derivados del ciclohexano ($C_6H_{12}O_6$). Existen nueve inositales isométricos, según el orden de los grupos de hidrógeno e hidroxilos en torno a los átomos de carbono del anillo (Michell, 2008).

3. Justificación

La obesidad es un factor asociado con el desarrollo de la DT2, debido a que se genera una disfunción en los adipocitos, ocasionando alteraciones en el estado redox y en el perfil inflamatorio, mecanismos que participan en el desarrollo de resistencia a la insulina. Dichas alteraciones se encuentran presentes en adipocitos 3T3-L1 incubados con glucosa 25 mM, en comparación con la incubación de glucosa 5 mM, por lo cual se determinó investigar el efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* en adipocitos incubados con ambas concentraciones de glucosa. Considerando que el estrés oxidante es uno de los mecanismos clave en la fisiopatología de la obesidad, es interesante evaluar el potencial antioxidante del extracto de *Cucurbita ficifolia*, por lo cual se propuso identificar y cuantificar las moléculas potencialmente antioxidantes que se encuentran en el extracto de *Cucurbita ficifolia*. Entre estos compuestos se cuantificó al DQI, el cual se ha sugerido como responsable de la acción hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia*, con la finalidad de demostrar si también es el responsable del efecto antioxidante, antiinflamatorio y sobre la resistencia a la insulina, a través de la activación de PKB (proteína que participa de manera importante en la señalización de la insulina). Esta investigación aportará información adicional para explicar los efectos observados con el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* y con algunos de sus componentes, fundamentando las bases para futuras investigaciones clínicas que permitan el desarrollo de nuevos fitofármacos o medicamentos para el control de enfermedades metabólicas crónicas.

4. Hipótesis

Si el DQI es el compuesto responsable de los efectos antioxidante y antiinflamatorio detectados *in vivo* con el extracto acuoso hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia*, entonces tanto el DQI sintético como el extracto acuoso mostrarán estos mismos efectos *in vitro* y en consecuencia activarán a PKB en adipocitos 3T3-L1.

5. Objetivo general

Evaluar y comparar el efecto del extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* (estandarizado con base en su contenido de DQI) y el DQI sintético para conocer si modulan el estado redox, la inflamación y la activación de PKB en adipocitos 3T3-L1 en presencia de dos concentraciones de glucosa (5 mM y 25 mM).

5.1 Objetivos particulares

- Identificar y cuantificar la presencia de DQI y otros compuestos con características antioxidantes: rutina, quercetina, catequina, ácido cumárico, ácido gálico, ácido ascórbico y nicotinamida en el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*.
- Determinar la influencia del extracto de *Cucurbita ficifolia* y del DQI sintético sobre el estado redox celular mediante la cuantificación de la relación

GSH/GSSG, la concentración intracelular del H_2O_2 y la actividad específica de las enzimas antioxidantes GPX y GR en adipocitos 3T3-L1.

- Determinar la influencia del extracto de *Cucurbita ficifolia* y del DQI sintético sobre la expresión del RNAm de las adipocinas: IL-6, TNF- α , resistina y adiponectina, así como su concentración en el medio de incubación en adipocitos 3T3-L1.
- Analizar la activación de PKB en adipocitos 3T3-L1 tratados con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y el DQI sintético.

6. Material y métodos

6.1 Preparación del extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*

El fruto de *Cucurbita ficifolia* fue colectado en Acolman, Estado de México (Herbario IMSS-M, Num. de registro 11,119). Para la preparación del extracto, el fruto se dejó sin cáscara, libre de bagazo y semillas; fue cortado en rebanadas delgadas y se dejó en aireación constante para su deshidratación. El material seco fue triturado en un molino eléctrico (Wiley) usando una rejilla de 1 mm de diámetro. Este material (400 g) fue sometido a maceración con agua (4 L) durante 72 h dentro de una campana de flujo laminar; cada 24 h se recuperó la fase acuosa, la cual fue liofilizada. El producto fue disuelto en medio de cultivo y filtrado (filtro de 0.22 µm) para aplicar los tratamientos a las células.

6.2 Cuantificación de DQI e identificación de compuestos antioxidantes en el extracto acuoso del fruto de *Cucurbita ficifolia*

El extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la identificación del DQI se usó un módulo de separación Waters 2695 y un detector de índice de refracción (Waters; Milford, MA, USA), utilizando una columna LiChrospher NH₂ 4 x 250 mm, 5 µm, 100 Å. La fase móvil consistió en acetonitrilo (CH₃CN) al 90% y H₂O al 10%, en un sistema isocrático que se mantuvo a un flujo de 1mL/min por 10 min. El estándar del DQI se inyectó (20 µL) a las concentraciones de 1.5, 3 y 6 mg/mL en el sistema de

HPLC, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.928. En el sistema se inyectaron 4 mg de extracto de *Cucurbita ficifolia* en un volumen de 20 μ L.

Para identificar los compuestos antioxidantes se utilizó un módulo de separación Waters 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters 2698 (Waters; Milford, MA, USA), utilizando una columna Prevail C18 150 x 4.6 mm, 5 μ m, 100 Å. Para la separación del ácido gálico el sistema de elución fue ácido trifluoroacético (TFA) 0.5% y CH₃CN/metanol (MeOH) 1:1; el gradiente comenzó con 95% de TFA y 5% de CH₃CN/MeOH, con un flujo de 1 mL/min durante 10 min. En el método de (\pm)-catequina el gradiente inició con 90% de TFA y 10% de CH₃CN/MeOH, con un flujo de 1.3 mL/min durante 13 min. En el L-ácido ascórbico la separación se realizó con un sistema de elución con TFA (0.5 %) y MeOH (100%), iniciando el gradiente con un 90% y 10%, respectivamente, con un flujo de 1 mL/min durante 10 min. Para el ácido p-cumárico se utilizó un sistema isocrático con TFA al 80% y CH₃CN al 20%, con un flujo de 1 mL/min durante 10 min. Se incluyeron diferentes concentraciones de cada uno de los estándares (0.125-10 mg/mL) y fueron inyectados en un volumen de 20 μ L. Los coeficientes de correlación para ácido gálico, (\pm)-catequina, L-ácido ascórbico y ácido p-cumárico fueron de 0.9, 0.99, 0.91 y 0.90, respectivamente. En el sistema se inyectaron de 2-8 mg de extracto de *Cucurbita ficifolia* en un volumen de 20 μ L.

Por último, para la identificación de nicotinamida también se utilizó un módulo de separación Waters 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters 2698, utilizando una columna Platinum C18 150 x 4.6 mm, 5 μ m, 100 Å. La fase móvil

consistió en TFA al 60%, MeOH al 20% y CH₃CN al 20% en un sistema isocrático que se mantuvo a un flujo de 1mL/min por 10 min. El estándar de nicotinamida se inyectó (20 µL) a las concentraciones de 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 µg/mL en el sistema de HPLC, obteniendo un coeficiente de correlación de 0.99. En el sistema se inyectaron 6 mg de extracto de *Cucurbita ficifolia* en un volumen de 20 µL.

6.3 Cultivo celular

Se cultivaron fibroblastos de la línea 3T3-L1 de ratón en medio DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”), con glucosa 25 mM, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM y gentamicina 20 µg/ml, complementado con suero fetal bovino al 10%; se mantuvieron a una temperatura de 37°C con atmósfera de 5% de CO₂. Dos días después de que los fibroblastos llegaron al 100% de confluencia (día 0), se indujo la diferenciación con 5-metil-3-hidroxi-butilxantina 500 µM, dexametasona 0.5 µM e insulina 1.2 µM en DMEM con suero fetal bovino al 10%. Al segundo día se cambió el medio adicionado con insulina 1.2 µM y se mantuvo por dos días más. A partir del cuarto día, el medio sin suplemento de insulina se reemplazó cada dos días. Las células fueron utilizadas a los ocho días de diferenciación para la administración de los diferentes tratamientos.

6.4 Viabilidad celular

Se cultivaron las células en placas de 96 pozos; a partir de los ocho días de diferenciación un lote de células se incubó en medio DMEM con glucosa 5 mM y otro lote continuó en el mismo medio con glucosa 25 mM. Se adicionó extracto de *Cucurbita ficifolia* a las concentraciones 0.125, 0.25, 0.5 y 0.75 mM, que se calcularon con base en su contenido de DQI, o se adicionó el DQI sintético a las mismas concentraciones. Se incluyó un control no tratado y las células se incubaron durante 24 y 48 h; la viabilidad se cuantificó con el uso del estuche comercial CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA). La solución de CellTiter 96 AQueous contiene 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), compuesto que es reducido por el NADPH o NADH producido por las células metabólicamente activas, formando formazán, un compuesto colorido detectado a 490 nm.

6.5 Relación de GSH/GSSG

Las células 3T3-L1 se cultivaron en placas de 6 pozos y se utilizaron después de los ocho días de la diferenciación. Los adipocitos en DMEM con glucosa 25 mM fueron tratados por 24 h con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sintético a diferentes concentraciones (0.0125, 0.025, 0.05, 0.125 y 0.25 mM). Además se adicionó un control positivo con N-Acetil-L-cisteína 20 mM (NAC, Boehringer Mannheim, Germany). En otro experimento, las células en DMEM con glucosa 5 y 25 mM se incubaron durante 24 y 48 h con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI

sintético, únicamente a concentraciones de 0.125 mM. Al finalizar los tratamientos las células se desprendieron con tripsina (0.1%) EDTA 0.25 mM y se centrifugaron a 80 x g. Las células fueron resuspendidas en PBS para la determinación inmediata de GSH; para GSSG se adicionó el compuesto 1-metil-2-trifluorometanosulfonato vinilpiridinium 1 (M2VP) en PBS. Las muestras fueron congeladas a -70°C hasta su uso. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford y se realizó la determinación de GSH y GSSG por el método de Ellman con un estuche comercial: GSH/GSSG Ratio Assay Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany). En el método se emplea el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), agente que reacciona con el GSH produciendo un producto detectable a 412 nm. En la determinación del GSSG, éste es reducido por la GR a GSH y, por lo tanto, puede ser determinado al reaccionar con el DTNB.

6.6 Determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) intracelular

En los siguientes experimentos los adipocitos con glucosa 25 mM fueron incubados con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sintético únicamente a la concentración de 0.125 mM por 24 y 48 h. Al concluir las incubaciones los adipocitos fueron desprendidos con tripsina (0.1%), centrifugados a 129 x g, 10 min, 4°C, y resuspendidos en PBS. Cada muestra se incubó con el fluorocromo 2', 7'-diclorofluoreceína diacetato 10 µM (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) por 30 min a 37°C, el cual emite su fluorescencia al oxidarse por el H₂O₂. La fluorescencia se cuantificó en un citómetro de flujo modelo FACSCan (Becton

Dickinson, Immunocytometer Systems), utilizando una longitud de excitación y de emisión de 488 y 530 nm, respectivamente.

6.7 Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR)

Al finalizar los tratamientos con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sintético a la concentración de 0.125 mM, los adipocitos fueron lisados con Tris 50 mM pH 7.4, EDTA 5 mM y DTT 1 mM, y centrifugados a 10,000 x g. En el sobrenadante se cuantificaron las actividades enzimáticas de GPX y GR mediante la producción de NADP⁺. Para la determinación de GPX la reacción se llevó a cabo en: Tris-HCl (pH 8, 50 mM), EDTA (0.5 mM), GSH (2mM), NADPH (0.25 mM), glutatión reductasa (0.5 U/ml) y terbutil-hidroperóxido (75 µM), adicionando 25 µl de muestra. En el caso de la determinación de la actividad de GR la mezcla fue conformada por: Tris (pH 8, 140 mM), EDTA (5 mM), GSSG (50 mg/ml) y NADPH (10 mg/ml) con 25 µl de muestra. En ambos casos se midió la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos. La actividad de ambas enzimas se mide por la oxidación de NADPH a NADP⁺ que es acompañado por un decremento en la absorbancia a 340 nm. En el caso de GR la oxidación del NADPH es directa, mientras que la actividad de GPX es determinada indirectamente por un acoplamiento con la actividad de GR que se lleve a cabo la formación de NADP⁺ (Figura 5).

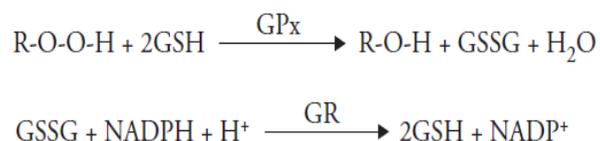


Figura 5. Reacciones para la determinación de GPX. La GPX cataliza la reducción del H₂O₂ o L-OOH, utilizando como sustrato el GSH para la transformación de GSSG y con el acoplamiento de la actividad de GR se lleva a cabo la oxidación de NADPH + H⁺, con cambios en la absorbancia.

6.8 Expresión del RNAm de las citocinas por RT-PCR tiempo real

Los adipocitos en DMEM con glucosa 5 ó 25 mM se incubaron durante 24 y 48 h con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sintético (0.125 mM). Se incluyeron células sin tratamiento con ambas concentraciones de glucosa. Para la extracción del RNA total, las células se cultivaron en placas de 6 pozos y se utilizó el método descrito por el proveedor del reactivo Tripure (Roche, Indianapolis, USA); la integridad y la pureza del RNA se determinó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% y con la relación A260/280 nm, respectivamente. La síntesis del DNAc se realizó a partir de 2 µg de RNA con el uso del estuche ImProm II (Promega, Madison, USA), con las siguientes condiciones: inicio a una temperatura de 25°C por 5 min, extensión a 42°C por 55 min y, por último, la reacción se detuvo a 70°C por 15 min. Al final los cDNAs se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para cuantificar la expresión de los RNAs mensajeros para IL-6, TNF-α, resistina, adiponectina y el gen de normalización 36B4 se usó del estuche de “DNA master plus SYBR Green 1” (Roche, indianapolis, USA) con los *primers* presentados en la Tabla 1. En el equipo LightCycler 2.0 de Roche se aplicó el programa de amplificación: preincubación de 10 min a 95°C, un segmento de

amplificación constituido por 40 ciclos y cada ciclo constituido por una desnaturalización de 95°C por 10 seg; un alineamiento a 61°C por 7 seg y una amplificación a 72°C por 10 seg. Los productos de PCR se detectaron al medir la fluorescencia emitida por el SYBR Green en el equipo LightCycler 2.0, cuando el SYBR Green se intercala entre la doble cadena del ADN es detectado a 530 nm, el incremento de la señal es proporcional a la cantidad de ADN doble cadena durante el PCR.

Tabla 1. *Primers* utilizados para el análisis de expresión mediante la técnica de RT-PCR para cada uno de los genes.

Gen	Secuencia de los “ <i>primers</i> ”	Producto	Gene Bank
IL-6	F5´-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3´ R5´-CAGAATTGCCATTGCACAAC -3´	129 pb	NM_031168.1
TNF-α	F5´-CCTCCCTGTCATCAGTTCTA-3´ R5´-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3´	102 pb	NM_013693.2
Resistina	F5´-GTACCCACGGGATGAAGAACCG-3´ R5´-GCAGAGCCACAGGAGCAG-3´	253 pb	NM_022984.3
Adiponectina	F5´-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3´ R5´-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3´	101 pb	NM_009605.4
36B4	F5´-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3´ R5´-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3´	135 pb	NM_007475.4

6.9 Determinación de las citocinas por el método de ELISA

Los adipocitos incubados con glucosa 25 mM fueron tratados con las diferentes concentraciones de *Cucurbita ficifolia* y DQI sintético. Se incluyó un control positivo tratado con rosiglitazona (5 μ M). En otro experimento los adipocitos fueron incubados con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sintético únicamente a la concentración de 0.125 mM con glucosa 5 ó 25 mM por 24 y 48 h. Después de los tratamientos se recuperó el medio de cultivo para cuantificar las citocinas por el método de ELISA. Ésta es una técnica de inmunoensayo en la cual un anticuerpo monoclonal se une específicamente a la proteína de interés; después, este complejo (proteína-anticuerpo) es reconocido por un segundo anticuerpo, el cual se encuentra unido a la enzima peroxidasa, la cual, al reaccionar con el peróxido de hidrógeno, forma un compuesto colorido que puede detectarse a 450 nm. Para la determinación de las citocinas se utilizaron estuches comerciales específicos para cada proteína: TNF- α (Abcam; USA), adiponectina (R & D Systems; Minneapolis, USA), IL-6 and resistina (Cusabio; Hubei Province, China).

6.10 Análisis de la activación de PKB por Western blot

Los adipocitos se trataron con *Cucurbita ficifolia* o con DQI por 24 h. Se incluyeron controles incubados con glucosa 5 y 25 mM sin tratamiento. Al final, se eliminó el medio de cultivo lavando las células con amortiguador de fosfatos Krebs-Ringer (KRP) suplementado con 0.5% de albumina libre de ácidos grasos. Para la activación de PKB, los adipocitos lavados se incubaron en KRP con 10 mM de

glucosa e insulina 1 μ M por 15 min. Para analizar si *Cucurbita ficifolia* o DQI activaban directamente a PKB, los adipocitos, se incubaron con los dos tratamientos en KRP por 30 min, sin el estímulo de insulina.

Al final de la última incubación, los adipocitos se lavaron con PBS y se lisaron con Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pirofosfato de sodio 2.5 mM, beta-glicerofosfato de sodio 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de fenilmetil-sulfonil 1 mM, aprotinina 5 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml, pepstatina 5 μ g/ml y tritón X100 al 1% y después de centrifugar a 20,124 x g, por 20 min, 4°C, se recuperó la fase acuosa. Se realizó la cuantificación de las proteínas por el método de Bradford y las proteínas se analizaron por western blot, para lo cual fueron separadas utilizando un gel SDS-PAGE al 8% y transferidas en membranas de fluoruro de polivinilideno. Las membranas fueron bloqueadas con albumina al 5% por 1 h e incubadas una noche con los anticuerpos primarios anti-PKB, anti-Fosfo-ser-473-PKB y anti- β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Después las membranas fueron incubadas por 2 h con el anticuerpo secundario anticonejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc), se revelaron con un reactivo quimioluminiscente (ECL Amersham, Little Chalfont Buckinghamshire) sobre una placa radiográfica (AGFA, Medical X-ray film, Florencio Varela, Argentina) y las imágenes se detectaron en un analizador de imágenes Gel Doc (Bio-Rad Laboratories, Valencia, CA, USA).

6.11 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student para comparar los grupos control. La prueba de ANOVA y la prueba complementaria Tukey-Kramer fueron utilizadas para evaluar diferencias entre grupos, considerando un intervalo de confianza del 95%, mediante el paquete estadístico NCSS.

7. Resultados

7.1 Cuantificación de DQI e identificación de compuestos antioxidantes en el extracto acuoso del fruto de *Cucurbita ficifolia*

En la Figura 6 se muestran los cromatogramas del estándar de DQI y del extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*. La presencia del DQI se identificó por el tiempo de retención (9.12 min) y la cantidad encontrada fue de 3.3 mg/g de extracto. Además se presentan los cromatogramas de los compuestos antioxidantes (en la figura 7 se identifican sus tiempos de retención). En la Tabla 2 se indica el contenido de (\pm)-catequina, L-ácido ascórbico, ácido p-cumárico, ácido gálico y nicotinamida; además se determinó la concentración de estos compuestos en el extracto (con base en el contenido de DQI).

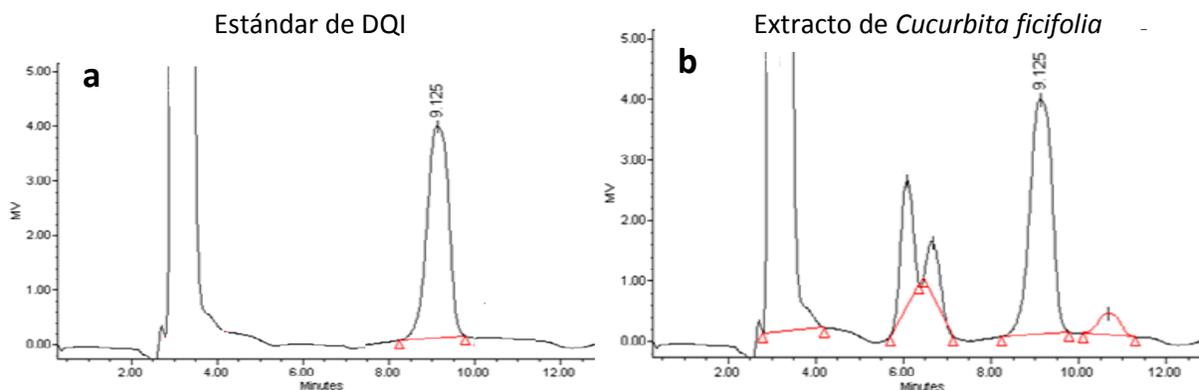


Figura 6. Identificación del DQI en el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*. Se muestran los cromatogramas del HPLC del DQI sintético (a) y la identificación del DQI en el extracto (b).

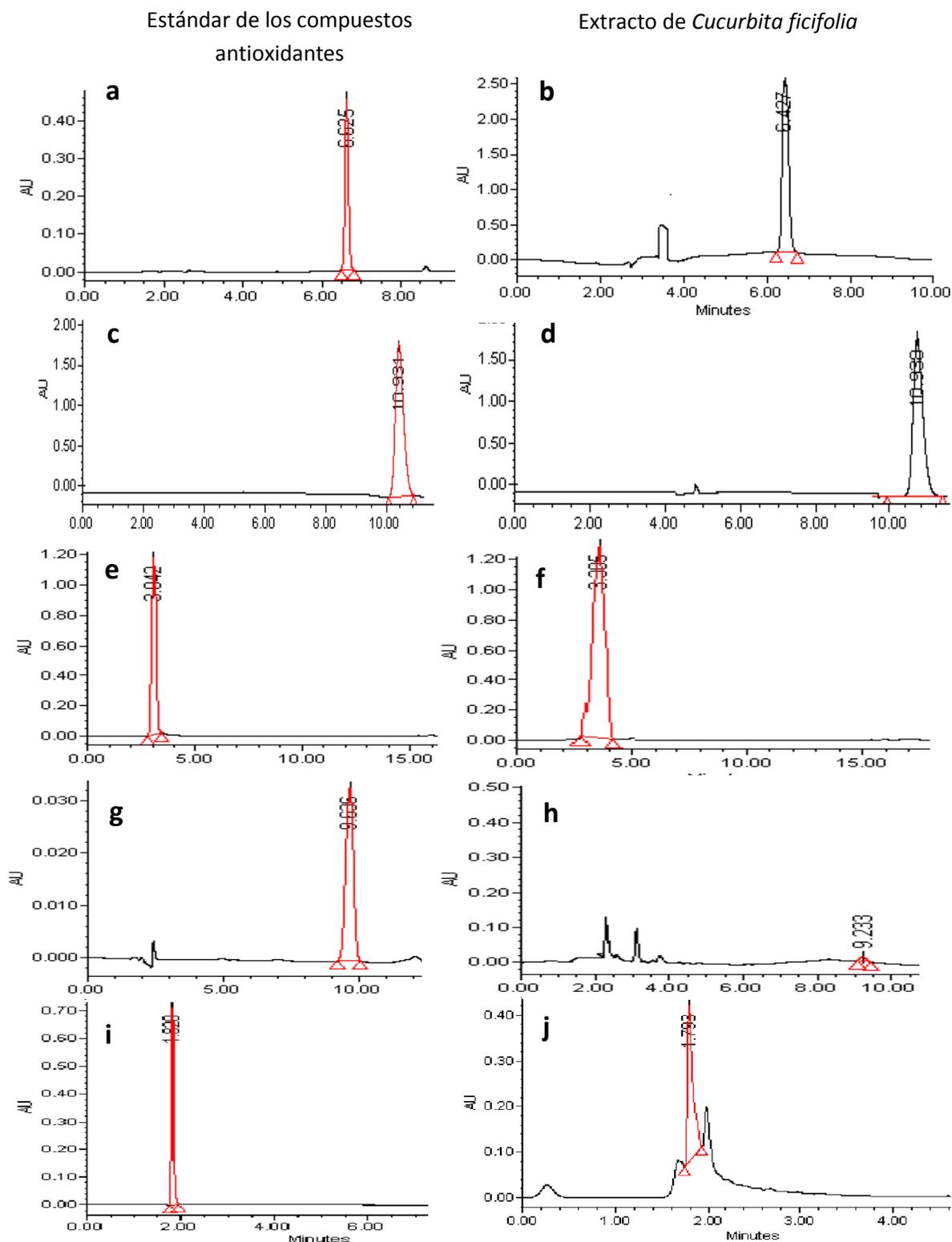


Figura 7. Identificación de compuestos antioxidantes en el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*. Cromatogramas de los estándares de los compuestos antioxidantes: ácido gálico (a), (\pm)-catequina (c), L-ácido ascórbico (e), p-cumárico (g) y nicotinamida (i). b, d, f, h y j) Cromatogramas de los diferentes compuestos antioxidantes en el extracto de *Cucurbita ficifolia*, según el tiempo de retención.

Tabla 2. Compuestos antioxidantes en el extracto de *Cucurbita ficifolia*.

Compuesto	Contenido (mg/g de extracto)	Concentración (μM) en el extracto
(\pm)-catequina	0.187	4.41
L-ácido ascórbico	0.136	5.11
Ácido p-cumárico	0.119	4.87
Ácido gálico	0.0046	0.18
Nicotinamida	2.8	157

Cuantificación de los antioxidantes por HPLC, el contenido se expresa en miligramos por gramo de extracto. Además se indica la concentración que fue administrada en los adipocitos: 0.125 mM de extracto con base en el contenido de DQI.

7.2 Viabilidad de las células 3T3-L1 tratadas con *Cucurbita ficifolia* o con DQI

En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos sobre la viabilidad celular. En las células incubadas por 24 h en medio con glucosa 5 mM y en presencia del extracto de *Cucurbita ficifolia* con un contenido de DQI de 0.5 mM, la viabilidad disminuyó 62.7%, mientras que a la concentración de 0.75 mM disminuyó hasta 86.2%. En los adipocitos incubados durante 24 h con glucosa 25 mM y con el extracto a las concentraciones de 0.5 y 0.75 mM (con base en el contenido de DQI), la viabilidad también disminuyó en un 49.8% y 59.5%, respectivamente. Después de 48 h de tratamiento con las concentraciones más altas de *Cucurbita ficifolia* se observó mayor decremento en la viabilidad (>90%),

independientemente de la concentración de glucosa. Por otra parte, el DQI sintético no alteró la viabilidad celular con ninguna de las concentraciones utilizadas (datos no mostrados). Debido a que las concentraciones mayores de 0.25 mM del extracto acuso afectaron la viabilidad, en los siguientes experimentos se utilizó el extracto o el DQI sintético a concentraciones menores de 0.25 mM.

Tabla 3. Viabilidad celular a diferentes concentraciones de DQI contenido en el extracto de *Cucurbita ficifolia* en adipocitos 3T3-L1 cultivados en glucosa 5 y 25 mM.

Concentración de DQI en <i>Cucurbita</i> <i>ficifolia</i>	% viabilidad Glucosa 5 mM		% viabilidad Glucosa 25 mM	
	24 h	48 h	24 h	48h
	0.125 mM	100.3 ± 0.7	99.5 ± 0.4	100.9 ± 1.2
0.250 mM	101.5 ± 2.7	101.3 ± 3.4	100.7 ± 1.7	99.9 ± 0.04
0.5 mM	37.2 ± 7.8 *	4.2 ± 0.6 *	50.7 ± 5.3 *	8.8 ± 0.2 *
0.75 mM	13.7 ± 0.8 *	1.6 ± 0.4 *	41 ± 4.5 *	1.6 ± 0.08 *

Comparación de los datos con respecto al 100% de viabilidad en el control respectivo (5 ó 25 mM). Los datos representan la media ± D.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control 5 ó 25 mM $p < 0.05$ (ANOVA).

7.3 Efecto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre el estrés oxidativo

Los adipocitos incubados con glucosa 25 mM a las 24 h de incubación presentaron un decremento significativo en las concentraciones de GSH y GSSG (25% y 40%, respectivamente), con incremento en la relación GSH/GSSG del 40%, comparados con los adipocitos incubados con glucosa 5 mM (Figuras 8 y 9). Los adipocitos incubados con glucosa 25 mM y con las diferentes concentraciones del extracto de *Cucurbita ficifolia* después de 24 h, aumentaron significativamente las concentraciones de GSH y GSSG con las concentraciones que van de 0.0125 hasta 0.125 mM (Figuras 8a y b), el efecto fue acompañado de una disminución en la relación GSH/GSSG (Figura 8c). Estos resultados fueron similares a los observados con NAC, utilizado como control positivo. Aunque el extracto de *Cucurbita ficifolia* a la concentración más alta utilizada (0.25 mM) no presentó cambios importantes sobre la concentración de GSH, GSSG aumentó significativamente (100%), observándose una reducción del 55% en la relación GSH/GSSG (Figuras 8b y c). Por su parte, el tratamiento con DQI, a partir de la concentración 0.05 hasta 0.25 mM, mostró un efecto dosis dependiente sobre el incremento en la concentración de GSH y GSSG y sobre la relación GSH/GSSG (Figura 9a, b y c). Tomando en cuenta que el extracto y el DQI a la concentración de 0.125 mM mostraron efecto positivo y significativo sobre los parámetros de estrés oxidativo, determinamos utilizar dicha concentración en los siguientes experimentos.

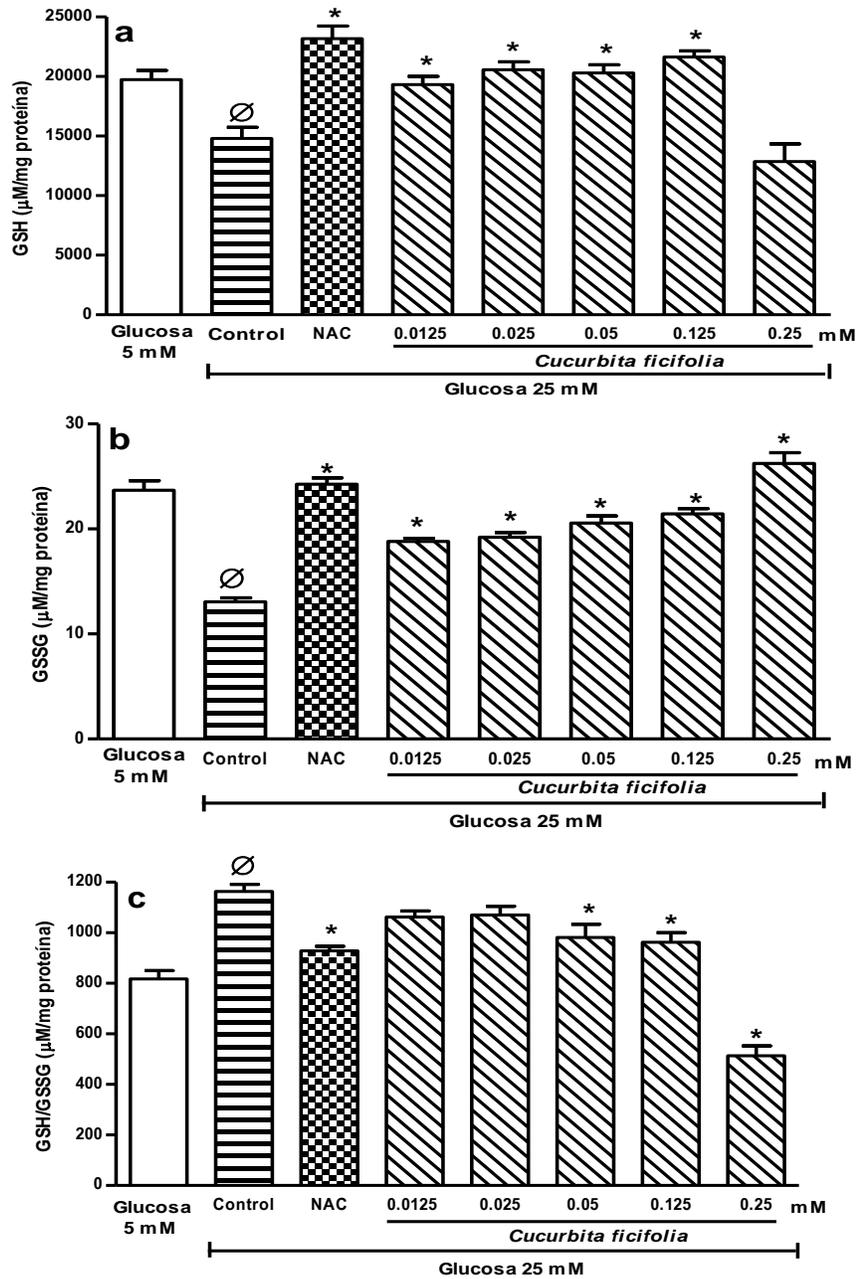


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones del extracto de *Cucurbita ficifolia* sobre la concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en adipocitos 3T3-L1. Las células incubadas con 25 mM de glucosa fueron tratadas con el extracto de *Cucurbita ficifolia* a diferentes concentraciones respecto a su contenido de DQI (0.0125, 0.025, 0.05, 0.125 y 0.25 mM) y fue incluido un control positivo con N-Acetil-L-cisteina (NAC, 20 mM). Se incluyeron células sin tratamiento incubadas con glucosa 5 y 25 mM. A las 24 horas de incubación se determinó la concentración de GSH (a), GSSG (b) y la relación GSH/GSSG (c). Los datos representan la media \pm D.E.M. (n=4) *Diferencia significativa con respecto al control 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). \emptyset Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

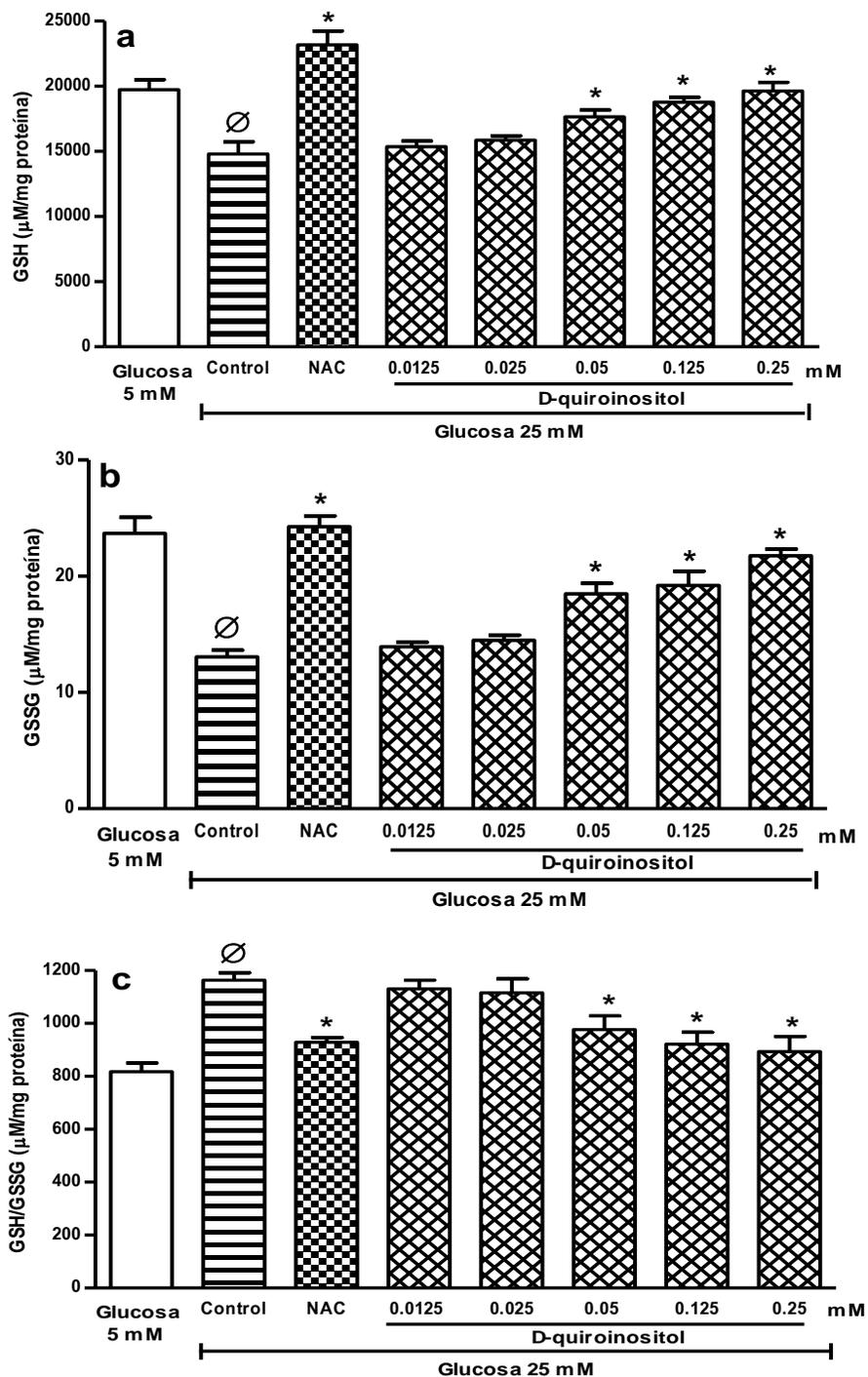


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de D-quirositol sobre la concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en adipocitos 3T3-L1. Los adipocitos en 25 mM de glucosa recibieron el tratamiento con DQI a diferentes concentraciones (0.0125, 0.025, 0.05, 0.125 y 0.25 mM) y se incluyó un control positivo tratado con N-Acetil-L-cisteína (NAC, 20 mM). Se incluyeron células sin tratamiento en glucosa 5 y 25 mM. A las 24 horas de incubación se determinó la concentración de GSH (a), GSSG (b) y la relación GSH/GSSG (c). Los datos representan la media \pm D.E.M. (n=4) *Diferencia significativa con respecto al control 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). \emptyset Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

En la Figura 10 se muestra el tratamiento de los adipocitos con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI en ambas concentraciones de glucosa (5 mM y 25 mM) durante 24 h y 48 h de incubación. Las alteraciones con respecto a GSH y GSSG en los adipocitos incubados en glucosa 25 mM, en comparación con la incubación de 5 mM a las 24 h, fueron modificadas por los tratamientos. Los adipocitos con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y con el DQI (ambos a 0.125 mM) incrementaron la concentración de GSH en un 45% y 30%, respectivamente, con respecto al control de glucosa 25 mM a las 24 h de incubación (Figuras 10a); el GSSG presentó un comportamiento similar al GSH con ambos tratamientos (Figura 10b). Mientras tanto, la relación GSH/GSSG disminuyó aproximadamente un 20% con ambos tratamientos (Figura 10c). Las concentraciones de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG a las 48 h incrementaron 21, 35 y 30%, respectivamente, en los adipocitos incubados con glucosa 25 mM, comparados con los adipocitos incubados con glucosa 5 mM. Estos resultados fueron similares a los observados a las 24 h (Figuras 10d-f). Los tratamientos con *Cucurbita ficifolia* y con el DQI a las 48 h incrementaron en un 30% tanto la concentración de GSH como la del GSSG (Figura 9d y e, respectivamente), con una disminución del 15% en la relación GSH/GSSG (Figura 10f). Por otra parte, en las células incubadas con glucosa 5 mM no se observaron diferencias significativas con *Cucurbita ficifolia* y con el DQI en ambos tiempos de incubación (Figura 10a-f).

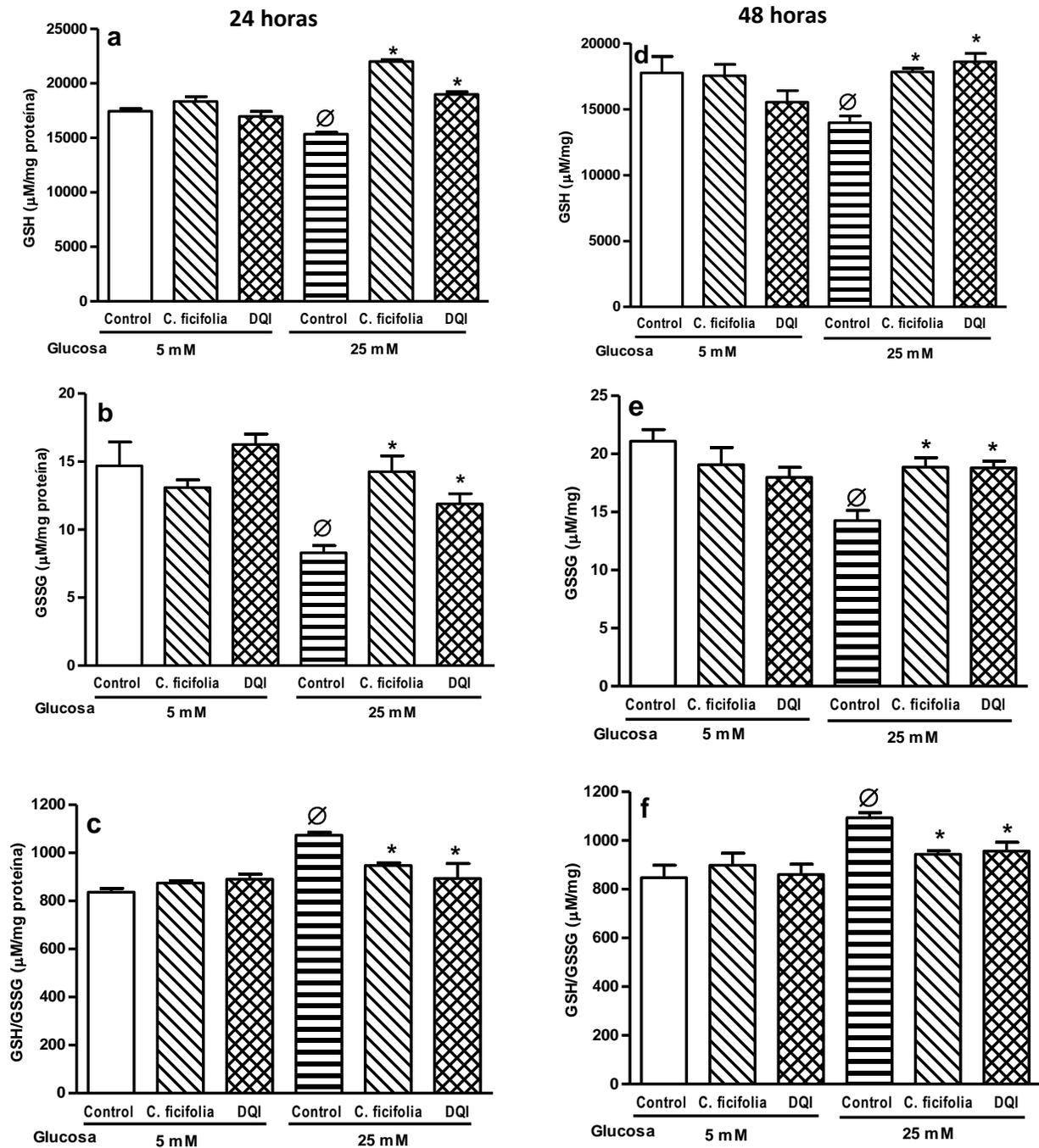


Figura 10. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre la concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en adipocitos 3T3-L1 a 24 y 48 h de incubación. Los adipocitos fueron tratados con el extracto de *C. ficifolia* (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI sintético (0.125 mM) en glucosa 5 y 25 mM, incluyendo células sin tratamiento con ambas concentraciones de glucosa. A las 24 horas y 48 horas de incubación se determinó la concentración de GSH (a y d), GSSG (b y e) y la relación GSH/GSSG (c y f). Los datos representan la media \pm D.E.M. (n=7) *Diferencia significativa con respecto al control 5 ó 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). [∅]Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

En los adipocitos incubados con glucosa 25 mM, el incremento en la relación de GSH/GSSG a las 24 y 48 h estuvo acompañado por una disminución aproximadamente del 24% en la actividad de la GPX y con un incremento del H₂O₂ (aproximadamente 25%) en ambos tiempos de incubación, sin que se observaran modificaciones en la actividad de GR (Figura 11). Los tratamientos con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y con el DQI incrementaron la actividad de la GPX en un 41% y 67%, respectivamente, a las 24 h de tratamiento (Figura 11a), conservando este efecto hasta las 48 h (Figura 11d); y observando incremento significativo de la actividad de GR sólo con el DQI (Figura 11e). Además, ambos tratamientos disminuyeron el H₂O₂ intracelular a las 24 h y 48 h (aproximadamente 40% y 31%, respectivamente) (Figuras 11c y f).

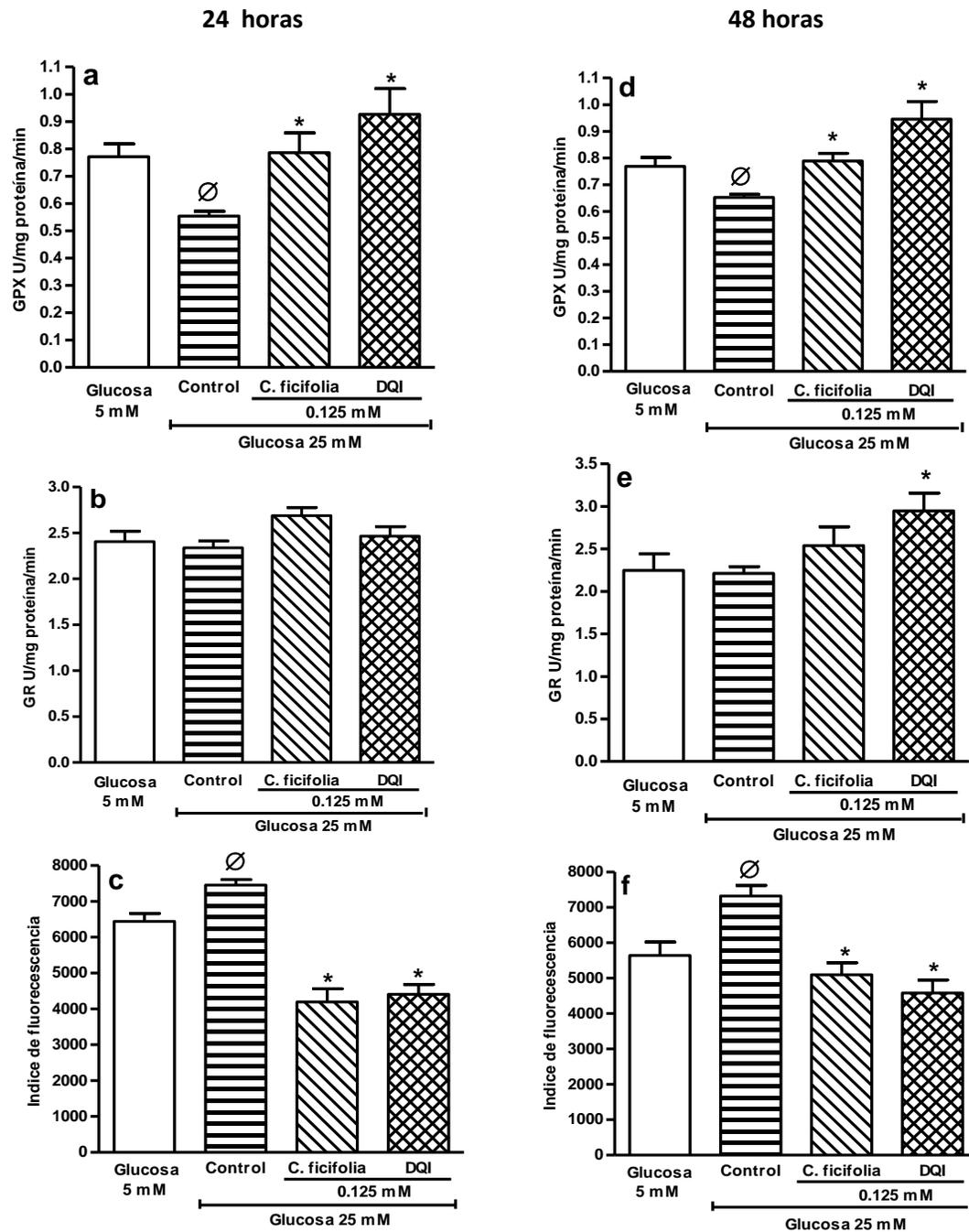


Figura 11. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y en la concentración de H₂O₂ en adipocitos 3T3-L1. Los adipocitos en glucosa 25 mM fueron tratados con el extracto de *C. ficifolia* (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI (0.125 mM). Se incluyeron células sin tratamiento con glucosa 5 y 25 mM durante 24 horas (a, b y c) y 48 horas de incubación (d, e y f). Al finalizar los tratamientos se determinó: la actividad de GPX (a y d), actividad de GR (b y e) y la concentración intracelular de H₂O₂, indicada por la fluorecencia de DCFH-DA (c y f). Media \pm D.E.M. (n=7) *Diferencia significativa con respecto al control 5 ó 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). \emptyset Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

7.4 Efecto de *Cucurbita ficifolia* y el DQI sobre la expresión de adipocinas

Los adipocitos incubados con glucosa 25 mM aumentaron significativamente la expresión del RNAm y la proteína de las citocinas inflamatorias IL-6, TNF- α y resistina, contra la expresión de las mismas en las células incubadas con glucosa 5 mM. En estos casos, la concentración de las proteínas TNF- α , IL-6 y resistina en los adipocitos con glucosa 25 mM a las 24 h incrementó en un 28, 50 y 25%, respectivamente (Figuras 12-14). A las 24 h de tratamiento con las diferentes concentraciones de DQI en el extracto de *Cucurbita ficifolia* no se observaron cambios importantes en la proteína TNF- α (Figura 12a), mientras que el DQI solo disminuyó significativamente esta citocina a las concentraciones de 0.125 y 0.25 mM (21y 25%, respectivamente) (Figura 12b). En el caso de la proteína IL-6 los tratamientos exhibieron efectos opuestos: *Cucurbita ficifolia* (0.125 y 0.25 mM) incrementó esta citocina (Figura 13a) y el DQI sintético (0.25mM) disminuyó la secreción de IL-6 en un 40% en los adipocitos (Figura 13b). Por otra parte, ambos tratamientos, a concentraciones de 0.05 a 0.25 mM, decrecieron la proteína resistina aproximadamente en un 20% (Figura 14a y b). La reducción de la concentración de las citocinas inflamatorias con los tratamientos mostró un comportamiento similar al control positivo (rosiglitazona), el cual presentó disminución de TNF- α , IL-6 y resistina (Figuras 12-14).

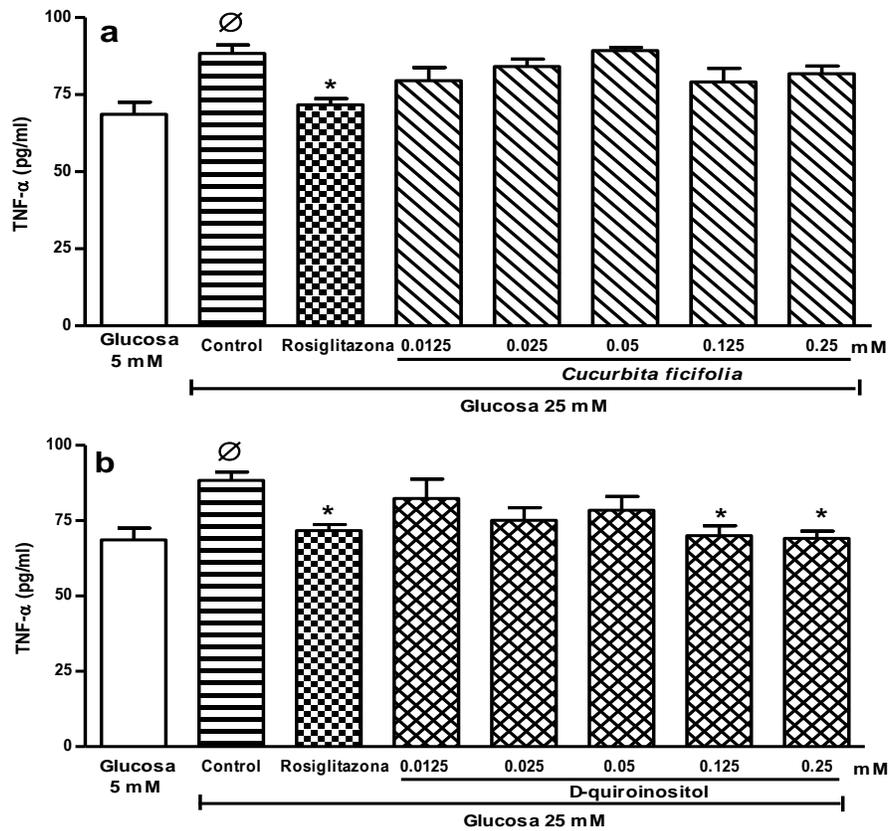


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones del extracto de *Cucurbita ficifolia* y D-quirositol sobre TNF- α en adipocitos 3T3-L1. Se determinó la concentración de TNF- α en el medio de cultivo en adipocitos incubados con 25 mM de glucosa y fueron tratados con el extracto de *Cucurbita ficifolia* conteniendo diferentes concentraciones de DQI (0.0125, 0.025, 0.05, 0.125 y 0.25 mM) (a) y a las mismas concentraciones se realizaron los tratamientos con DQI (b) por 24 horas. Se incluyó un control positivo tratado con Rosiglitazona (5 μ M) y células sin tratamiento en glucosa 5 y 25 mM. Media \pm D.E.M. (n=4) *Diferencia significativa con respecto al control 5 ó 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). \emptyset Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

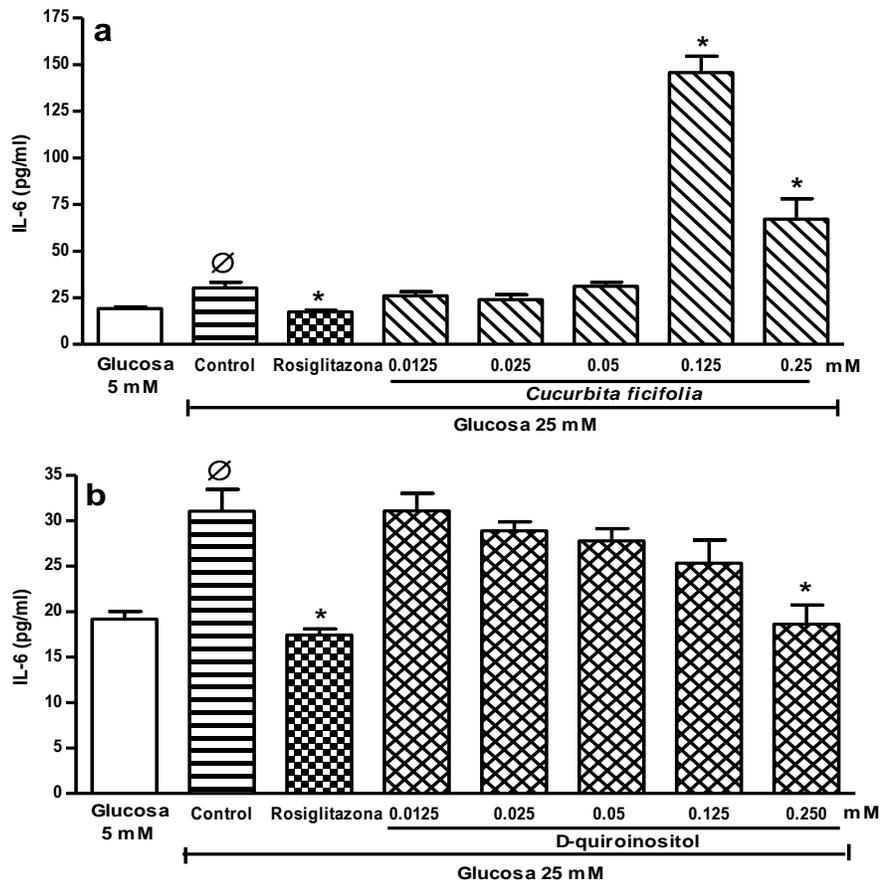


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones del extracto de *Cucurbita ficifolia* y D-quirositol sobre IL-6 en adipocitos 3T3-L1. A las 24 horas de incubación se determinó la concentración de IL-6 en el medio de cultivo de adipocitos incubados con glucosa 25 mM, los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones (0.0125, 0.025, 0.05, 0.125 y 0.25 mM) de *Cucurbita ficifolia*, respecto a su contenido de DQI (a) y los tratamientos con DQI se realizaron a las mismas concentraciones (b). Se incluyó un tratamiento con rosiglitazona (5 μ M) como control positivo y, como controles sin tratamiento, las células fueron incubadas con glucosa 5 y 25 mM. Los datos representan la media \pm D.E.M. (n=4) *Diferencia significativa con respecto al control 5 ó 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). \emptyset Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

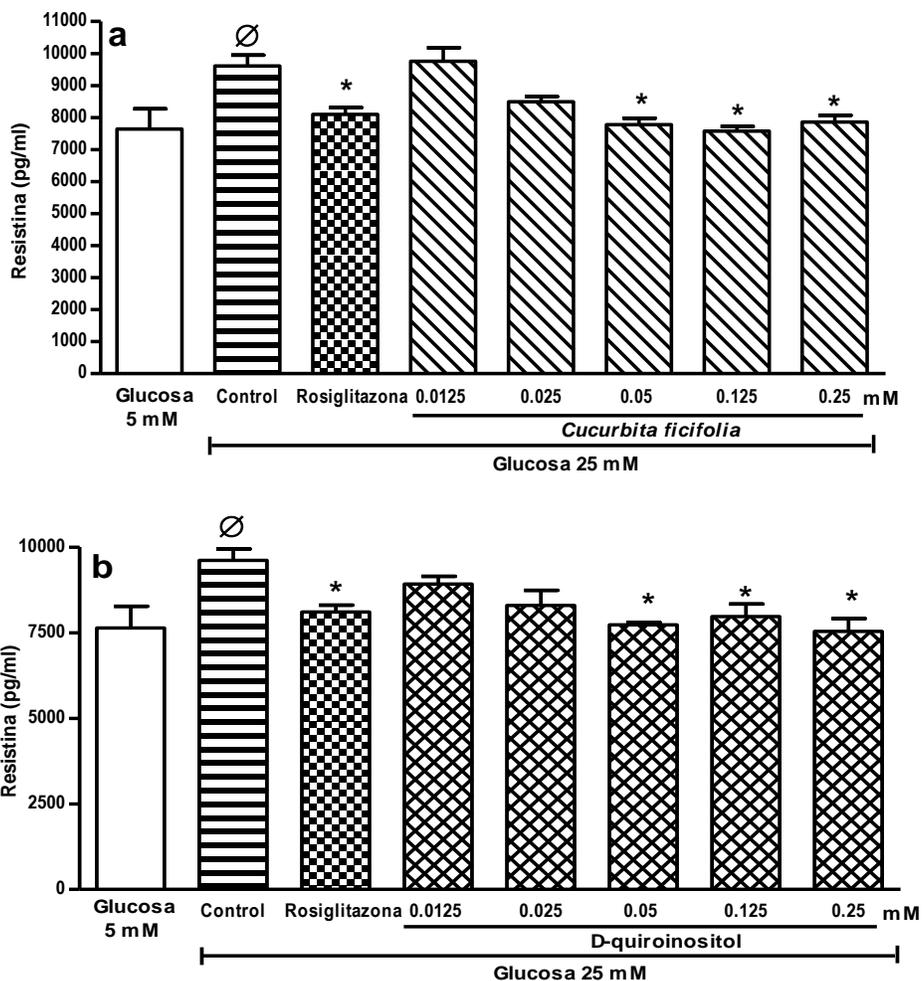


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones del extracto de *Cucurbita ficifolia* y D-quirositol sobre resistina en adipocitos 3T3-L1. A las 24 horas de incubación se determinó la secreción de la proteína resistina en el medio de cultivo, en adipocitos incubadas en 25 mM de glucosa, los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones (0.0125, 0.025, 0.05, 0.125 y 0.25 mM) de *Cucurbita ficifolia*, respecto a su contenido de DQI (a) y a las mismas concentraciones se realizó los tratamientos con DQI (b). Se incluyó un control positivo tratado con rosiglitazona (5 μM) y células sin tratamiento en glucosa 5 y 25 mM. Los datos representan la media ± D.E.M. (n=4) *Diferencia significativa con respecto al control 5 ó 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). [∅]Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

En los siguientes experimentos se muestra la expresión del RNAm y proteína de las citocinas inflamatorias en adipocitos con glucosa 5 y 25 mM, así como los tratamientos de *Cucurbita ficifolia* y DQI a la concentración de 0.125 mM. En las células incubadas con glucosa 5 mM, el extracto incrementó significativamente en un 70% la expresión del RNAm de TNF- α a las 24 y a las 48 h el incremento fue de 180%, mientras que la proteína incrementó un 65% sólo a las 24 h de incubación (Figura 15a-c). Respecto a IL-6, la presencia del extracto no produjo cambios a las 24 h de incubación sobre el RNAm; sin embargo incrementó significativamente a las 48 h, mientras que la secreción de IL-6 se incrementó a partir de las 24 h (Figura 16a-c). A las 48 h de incubación el incremento de la proteína IL-6 con *Cucurbita ficifolia* es consistente con el aumento significativo en la expresión del RNAm (Figura 16b y d). Por otra parte, el tratamiento con DQI no modificó la expresión y secreción de TNF- α e IL-6 en los adipocitos incubados con glucosa 5 mM.

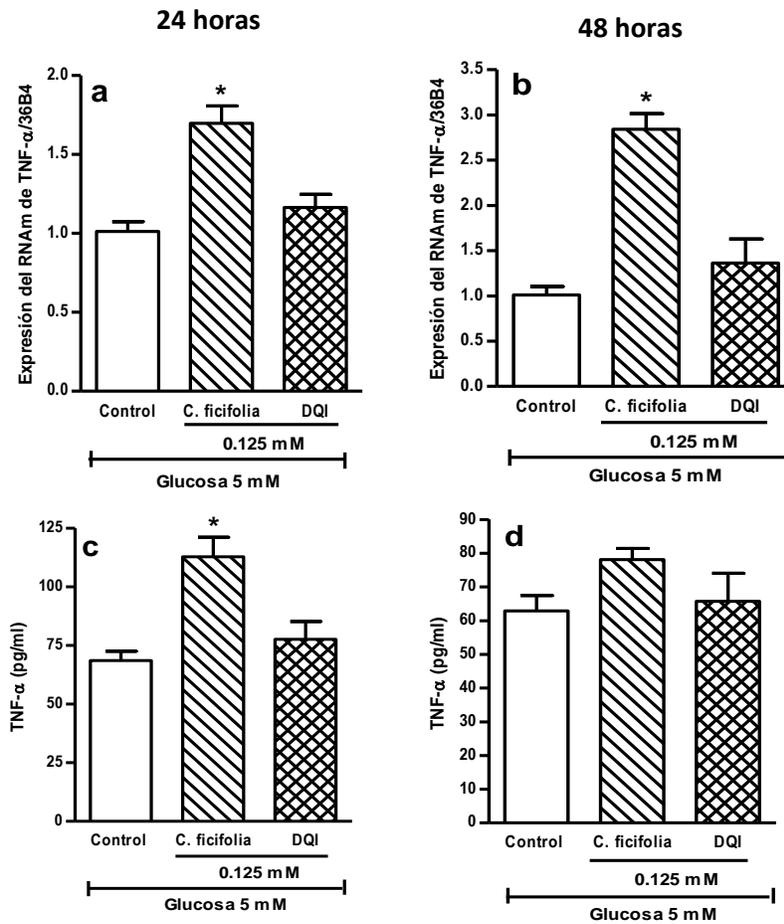


Figura 15. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y D-quirositol sobre el RNAm y proteína de TNF- α en adipocitos 3T3-L1 incubados en glucosa 5 mM. Los adipocitos en glucosa 5 mM fueron tratados con el extracto de *C. ficifolia* (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI (0.125 mM) durante 24 horas y 48 horas de incubación. Para la determinación de la expresión del RNAm (a y b) y proteína de TNF- α en el medio de cultivo (c y d). Los datos representan la media \pm D.E.M. (RNAm n=6 y proteína n=4). *Diferencia significativa con respecto al control 5 mM, $p < 0.05$ (ANOVA).

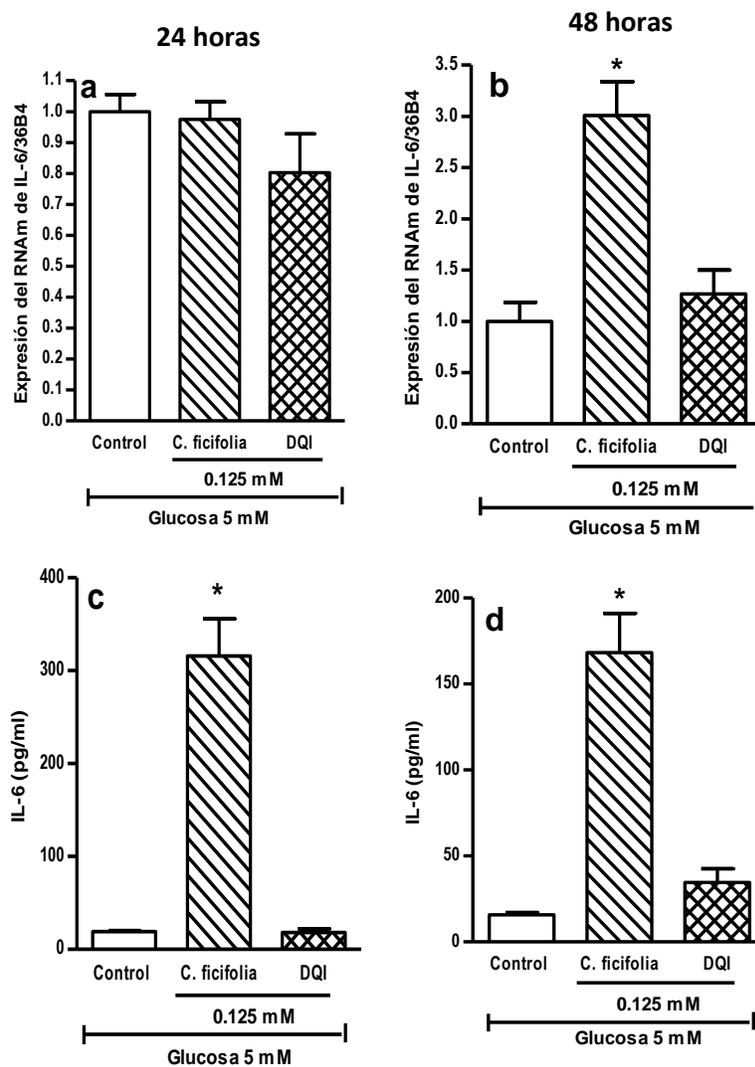


Figura 16. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y D-quirositol sobre el RNAm y proteína de IL-6 en adipocitos 3T3-L1 incubados en 5 mM de glucosa. Los adipocitos en glucosa 5 mM fueron tratados con el extracto de *C. ficifolia* (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI (0.125 mM) durante 24 horas y 48 horas de incubación. Para la determinación de la expresión del RNAm (a y b) y proteína de IL-6 en el medio de cultivo (c y d). Los datos representan la media \pm D.E.M. (RNAm n=4 y proteína n=4). *Diferencia significativa con respecto al control 5 mM, $p < 0.05$ (ANOVA).

En los adipocitos incubados con glucosa 25 mM, el RNAm de TNF- α se incrementó en 46% y 35% a las 24 y 48 h de incubación, respectivamente, en comparación con los adipocitos incubados con 5 mM de glucosa. La proteína liberada al medio se incrementó aproximadamente en 20% en ambos tiempos (Figura 17). Los adipocitos incubados con glucosa 25 mM y tratados con *Cucurbita ficifolia* y DQI a la concentración de 0.125 mM, mostraron una reducción en la expresión del RNAm de TNF- α desde las 24 h, siendo de un 30% con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y un 51% con DQI a las 48 h (Figura 17a y b). Solamente el DQI redujo en aproximadamente el 25% el nivel de la proteína TNF- α en ambos tiempos de incubación (Figura 17c y d).

La expresión del mRNA de IL-6 en los adipocitos incubados con glucosa 25 mM se incrementó en 45%, mientras que los niveles de la proteína aumentaron 52% a las 48 h, comparados con los adipocitos incubados con glucosa 5 mM (Figura 18). El extracto de *Cucurbita ficifolia* (0.125 mM) incrementó la expresión del RNAm de IL-6 a las 24 y 48 h (31% y 40%, respectivamente) (Figura 18a y b). El incremento en el RNAm de IL-6 en ambos tiempos de incubación fue consistente con el aumento significativo de la proteína (Figura 18c y d). Por el contrario, el DQI (0.125 mM) disminuyó el RNAm de IL-6 un 31% las 24 h y un 41% a las 48 h (Figura 18a y b), sin afectar la concentración de proteína.

En los adipocitos incubados con glucosa 25 mM por 24 h, la expresión del RNAm y de la proteína resistina se incrementaron en aproximadamente 50% y 25%, respectivamente, en comparación con los adipocitos incubados con 5 mM de

glucosa. Este comportamiento fue similar a las 48 h de incubación (Figura 19). Ambos tratamientos a la concentración de 0.125 mM disminuyeron la expresión del RNAm de resistina aproximadamente 30% y 40% a las 24 h y 48 h, respectivamente (Figuras 19a y b). Además la secreción de resistina disminuyó aproximadamente 20% en ambos tiempos de tratamiento (Figuras 19c y d).

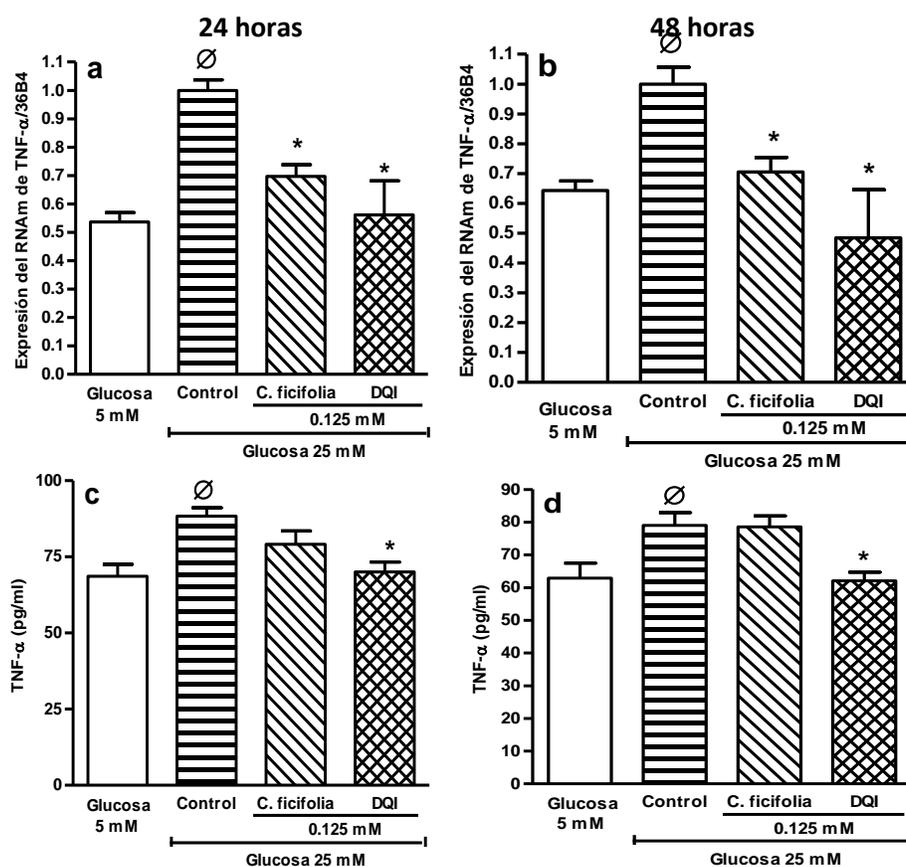


Figura 17. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre la expresión del RNAm y proteína de TNF- α en células 3T3-L1 incubadas con glucosa 25 mM. Se determinó la expresión del RNAm (a y b) y proteína (c y d) de TNF- α en medio de cultivo de los adipocitos incubados con 25 mM de glucosa con el tratamiento del extracto (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI (0.125 mM), después de 24 y 48 horas. Los resultados fueron normalizados con respecto al control glucosa 25 mM. Los datos representan la media \pm D.E.M. (RNAm n=6 y proteína n=4). *Diferencia significativa con respecto al control 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). \emptyset Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

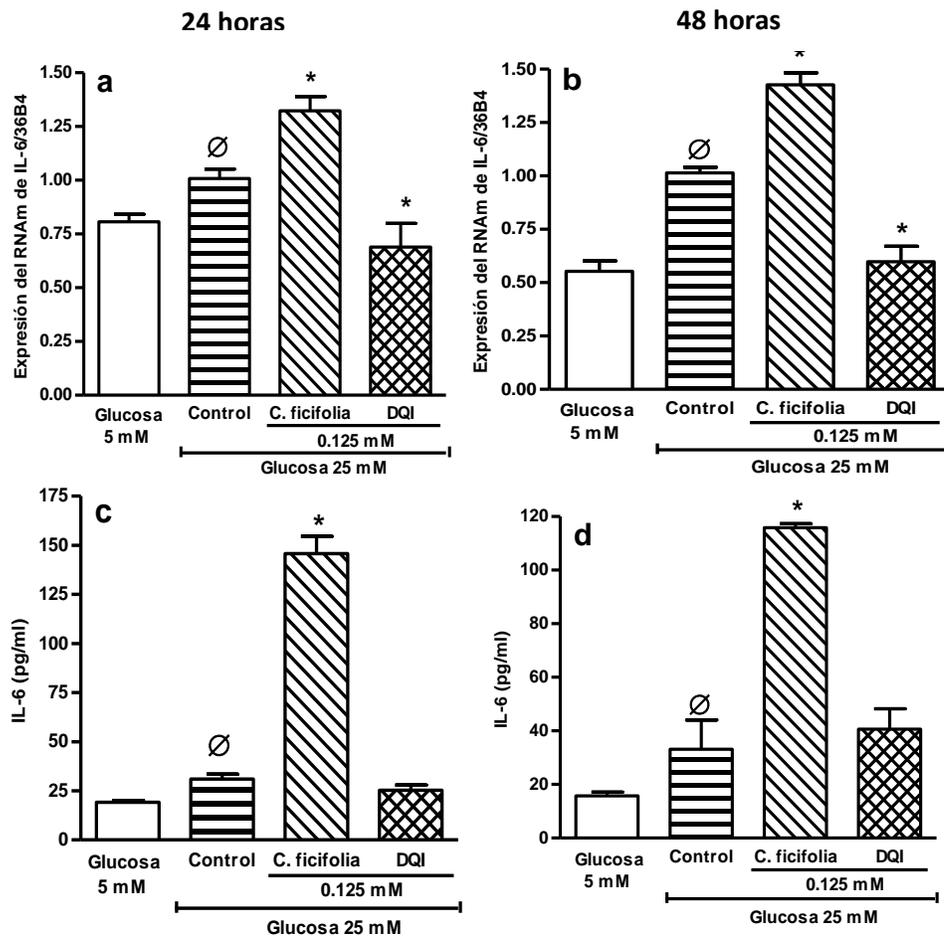


Figura 18. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI en la expresión del RNAm y proteína de IL-6 en adipocitos 3T3-L1 incubados con glucosa 25 mM. Expresión del RNAm (a y b) y proteína (c y d) de IL-6 en las células incubadas con glucosa 25 con los tratamientos de *C. ficifolia* (concentración de DQI 0.125mM) y el DQI (0.125mM), después de 24 horas (a y c) y 48 horas (b y d). Los datos se normalizaron con respecto al control glucosa 25 mM. Media \pm D.E.M (RNAm n=6 y proteína n=4) *Diferencia significativa con respecto al control 25 mM $p < 0.05$ \emptyset Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

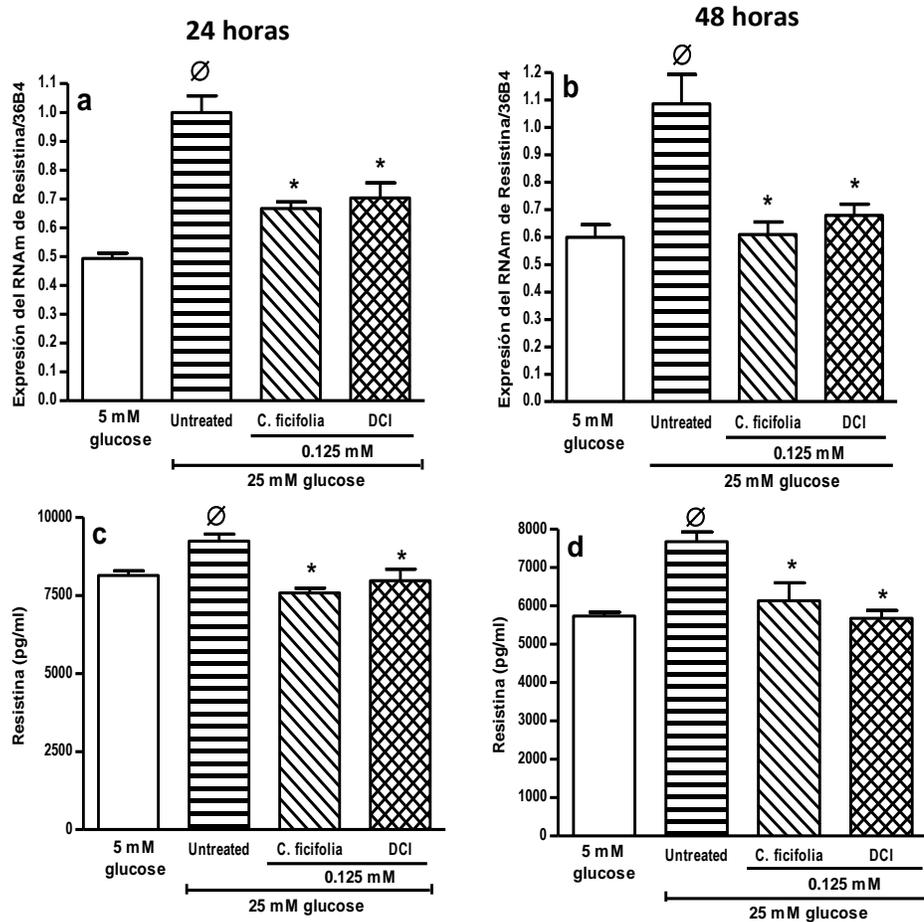


Figura 19. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre la expresión del RNAm y proteína de resistina en células 3T3-L1 incubadas en glucosa 25 mM. Determinación de la expresión del RNAm (a y b) y proteína (c y d) de resistina en el medio de cultivo de los adipocitos incubados con 25 mM de glucosa con el tratamiento del extracto (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI (0.125 mM), después de 24 y 48 horas. Los resultados fueron normalizados con respecto al control de glucosa 25 mM. Los datos representan la media \pm D.E.M. (RNAm n=6 y proteína n=4). *Diferencia significativa con respecto al control 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). Ø Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

En los adipocitos 3T3-L1 tratados con el extracto de *Cucurbita ficifolia* y con el DQI en glucosa 5 mM no se observaron cambios importantes, en la expresión del RNAm y en la proteína de adiponectina (Figuras 20a-c). Respecto a los adipocitos incubados con glucosa 25 mM por 24 h y 48 h, la expresión del RNAm y de la proteína de adiponectina no mostraron cambios significativos, en comparación con los adipocitos incubados con glucosa 5 mM. Ambos tratamientos no produjeron modificaciones en glucosa 25 mM (Figura 21a-c).

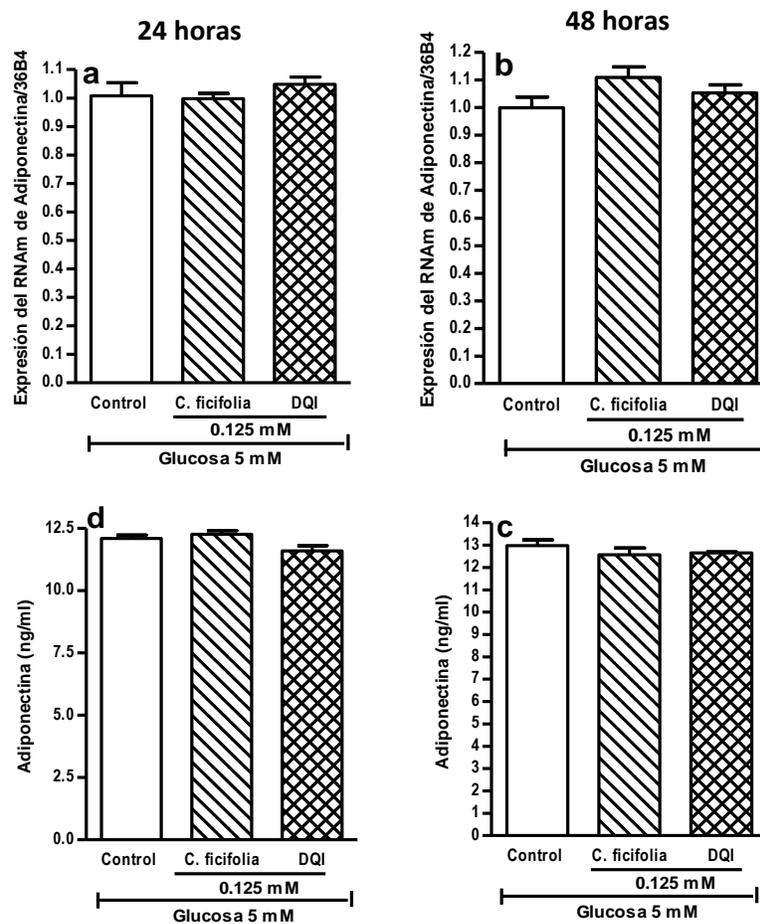


Figura 20. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y D-quirositol sobre el RNAm y proteína de adiponectina en adipocitos 3T3-L1 incubados en 5 mM de glucosa. Los adipocitos en glucosa 5 mM fueron tratados con el extracto de *C. ficifolia* (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI (0.125 mM) durante 24 horas y 48 horas de incubación. Para la determinación de la expresión del RNAm (a y b) y proteína de IL-6 en el medio de cultivo (c y d). Los datos representan la media \pm D.E.M. (RNAm n=4 y proteína n=4). *Diferencia significativa con respecto al control 5 mM, $p < 0.05$ (ANOVA).

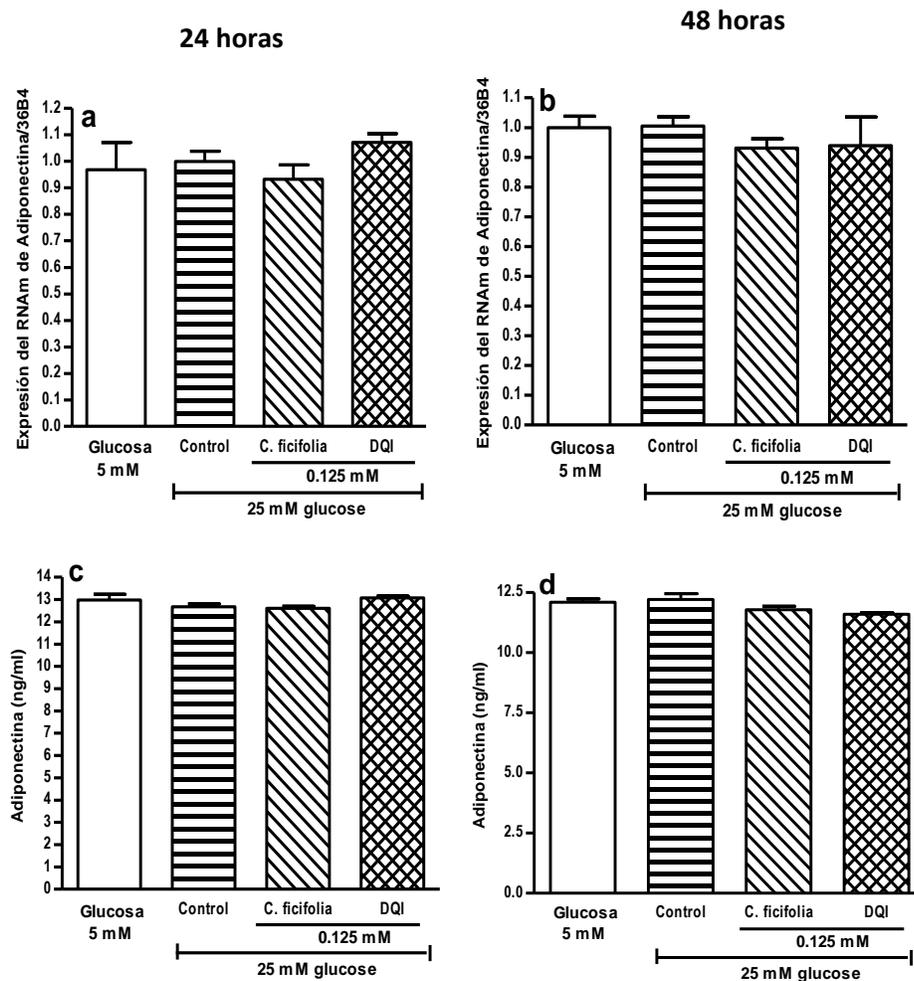


Figura 21. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre la expresión del RNAm y proteína de adiponectina en células 3T3-L1 incubados en glucosa 25 mM. Determinación de la expresión del RNAm (a y b) y proteína (c y d) de adiponectina en el medio de cultivo de los adipocitos incubados con 25 mM de glucosa con el tratamiento del extracto (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI (0.125 mM), después de 24 horas (a y c) y 48 horas (b y d). Los resultados fueron normalizados con respecto al control de glucosa 25 mM. Los datos representan la media \pm D.E.M. (RNAm n=6 y proteína n=4). *Diferencia significativa con respecto al control 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA). ϕ Diferencia significativa con respecto al control 5 mM $p < 0.05$ (t de Student).

7.5 Efecto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre la activación de PKB

La activación de PKB, determinada por la fosforilación en ser-473, se llevó a cabo en los adipocitos incubados con glucosa 5 y 25 mM, en presencia de insulina 1 μ M, sin mostrar diferencias entre las dos concentraciones de glucosa (datos no mostrados). Después de incubar los adipocitos con el extracto de *Cucurbita ficifolia* o DQI por 24 h, la activación de PKB dependiente de insulina, presentó tendencia a incrementar, sin ser significativa. De manera importante PKB sí se activó en presencia de DQI por 30 min, sin el estímulo de insulina (Figura 22).

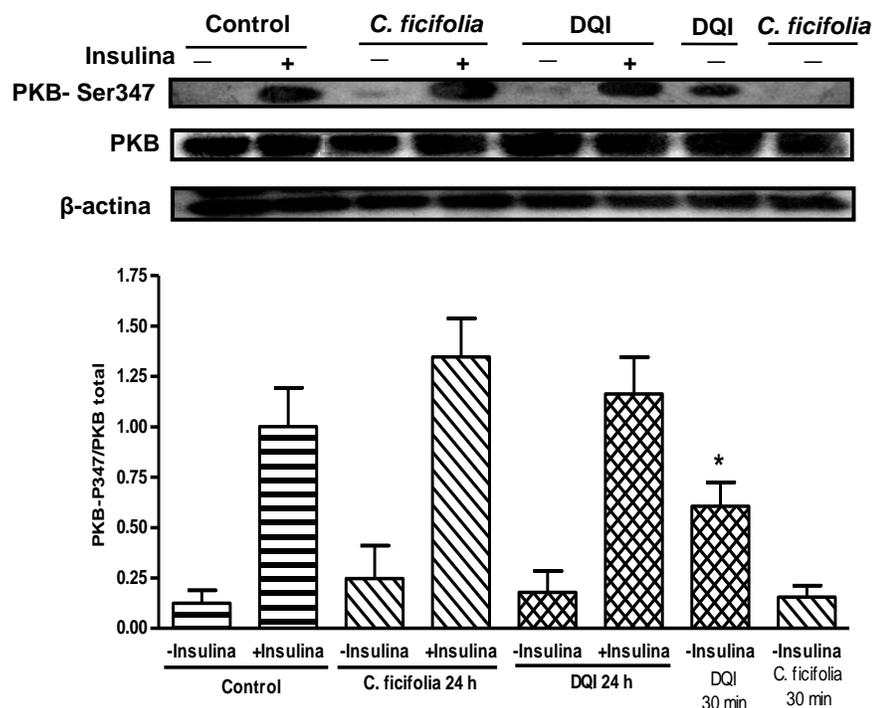


Figura 22. Efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI sobre la fosforilación de PKB-ser473 en adipocitos 3T3-L1. Los adipocitos con 25 mM de glucosa fueron tratados por 24 horas con el extracto (concentración de DQI 0.125 mM) y DQI sintético (0.125 mM). Después de los tratamientos las células fueron incubadas por 15 minutos en presencia o ausencia de insulina (1 μ M). En otro experimento, los adipocitos fueron incubados con *Cucurbita ficifolia* y DQI sintético solamente por 30 minutos, sin estímulo de insulina. Media \pm D.E.M. (n=3). *Diferencia significativa con respecto al control 25 mM, $p < 0.05$ (ANOVA).

8. Discusión

En el desarrollo de la obesidad se puede producir aumento en el tamaño del adipocito por un exceso en la cantidad de lípidos almacenados (hipertrofia) y/o aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) en el mismo tejido adiposo (Torres-Leal *et al.*, 2010). Estas alteraciones repercuten en las funciones del adipocito, incluyendo modificaciones en la señalización de la insulina, en la expresión y/o secreción de citocinas inflamatorias y en el estrés oxidativo (Kobayashi *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2011). En los adipocitos 3T3-L1, una concentración alta de glucosa (25 mM) produce defectos en el estado redox y en la inflamación, en comparación con los adipocitos incubados con glucosa 5 mM. Dichas alteraciones se han asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina (Lin *et al.*, 2005).

En el presente estudio, los adipocitos incubados con glucosa 25 mM presentaron alteraciones en la vía redox del glutati6n, que se manifestó por el incremento en la relación GSH/GSSG y la disminuci6n en la actividad de la GPX, enzima encargada de catalizar la reacci6n entre el GSH y el H₂O₂, lo cual conduce al incremento del H₂O₂ en estos adipocitos.

El H₂O₂, los ácidos grasos libres y el TNF- α son factores que disminuyen la actividad de la GPX (Kobayashi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008). Por lo cual se propone que el extracto de *Cucurbita ficifolia* y el DQI podrían mejorar el funcionamiento de la vía redox del glutati6n, debido al restablecimiento en la actividad de GPX que se refleja en el aumento en la concentraci6n de GSH y

GSSG con la disminución de la relación GSH/GSSG y del H₂O₂ intracelular. Estos efectos fueron similares a los observados tanto en los adipocitos con el tratamiento de N-acetil-cisteína (control positivo) como en los adipocitos incubados con glucosa 5 mM sin tratamiento. El efecto antioxidante de DQI se ha reportado en células endoteliales por la disminución en la cantidad de O₂^{•-}, molécula que por acción de la enzima superóxido dismutasa es convertida a H₂O₂ (Nascimento *et al.*, 2006). Así, el DQI sintético o los otros compuestos contenidos en el extracto, podrían evitar la formación de H₂O₂ al disminuir el O₂^{•-}.

Aunque ambos tratamientos presentaron efecto antioxidante, el extracto de *Cucurbita ficifolia* incrementó la concentración de GSH y GSSG desde la concentración más baja (0.0125 mM) hasta 0.125 mM, mientras que DQI presentó este efecto de 0.05 mM a 0.250 mM. Esto indicaría que el efecto antioxidante de *Cucurbita ficifolia* podría deberse, al menos en parte, a su contenido de DQI, ya que el extracto contiene otros antioxidantes como compuestos fenólicos ((±)-catequina, ácido p-cumárico, ácido gálico), L-ácido ascórbico y nicotinamida, que pueden contribuir a que se presente el efecto antioxidante del extracto desde 0.0125 mM. Y aunque la concentración de estos compuestos es baja en el extracto (como se menciona en la Tabla 2), el efecto antioxidante del extracto en los adipocitos puede ser por un efecto sinérgico de todos los compuestos mencionados. La pérdida del efecto antioxidante del extracto de *Cucurbita ficifolia* a 0.25 mM por el incremento de GSSG y la disminución de la relación de GSH/GSSG podría indicar un efecto prooxidante. Lo anterior podría explicarse por el hecho de que algunos antioxidantes como el ácido ascórbico presentan acción

prooxidante a altas concentraciones (Mandl *et al.*, 2009). Por esta razón, aún es necesario continuar con la caracterización química del extracto, para determinar si además de los ya mencionados existen otros compuestos antioxidantes en el mismo. Es importante seguir el estudio de estos compuestos debido a que algunos flavonoides, adicional a su efecto antioxidante, aumentan la translocación de GLUT-4 (Li *et al.*, 2007), mientras que con la nicotinamida se ha reportado un efecto hipoglucemiante en ratones con diabetes experimental (Novelli *et al.*, 2010).

Los adipocitos incubados con glucosa 25 mM, además de presentar cambios en el estado redox, mostraron un aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α y resistina. El DQI sintético redujo la expresión del RNAm y la secreción de estas citocinas con un comportamiento similar al tratamiento con rosiglitazona (control positivo). Mientras que *Cucurbita ficifolia* disminuyó la expresión del RNAm de TNF- α y secreción de resistina. Se ha determinado que las especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂ pueden activar a la IKK β cinasa que regula la activación de NF- κ B, factor que regula la transcripción de citocinas proinflamatorias (Evans *et al.*, 2005). Por lo tanto, los tratamientos, al disminuir el estrés oxidativo, podrían como consecuencia evitar la activación del NF- κ B. Por otra parte, sería importante el estudio de otros compuestos en el extracto de *Cucurbita ficifolia*. Así por ejemplo se han reportado en varias cucurbitáceas algunas cucurbinacinas con actividad antiinflamatoria debido a que inhiben la activación de NF- κ B (Abdelwahab *et al.*, 2011; Jayaprakasam *et al.*, 2003, Qiao *et al.*, 2013), aunque también se les ha asociado con efecto citotóxico

y antitumoral, proponiéndose que actúan a través de la activación de receptores a glucocorticoides (Witkowski y Konopa, 1981).

A diferencia del DQI, el tratamiento con *Cucurbita ficifolia* incrementó la secreción de IL-6; se reconoce que esta citocina tiene una acción inflamatoria durante la obesidad, con efectos importantes sobre la resistencia a la insulina, que adicionalmente se ha asociado con un decremento en adiponectina (Torres-Leal *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no podemos determinar si este efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* sobre IL-6 es benéfico o perjudicial, ya que el tratamiento no modificó la expresión de adiponectina. Además, en ratones diabéticos la administración del extracto también incrementó los niveles séricos de IL-6 (Roman-Ramos *et al.*, 2012). Proponemos que este efecto podría alterar el metabolismo de lípidos, de manera similar a lo mostrado con algunos compuestos (oligosacáridos), que estimulan la expresión de IL-6 en células 3T3-L1, y disminuyen la lipogénesis y la adipogénesis (Bahar *et al.*, 2011), a través de la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (Bunn *et al.*, 2010). Así, resulta interesante estudiar el efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* sobre la acumulación de tejido adiposo *in vivo*, ya que en ratones obesos la administración de IL-6 disminuye el peso corporal (Wallenius *et al.*, 2002). Por lo tanto, aún faltan estudios adicionales para explicar estos efectos del extracto, así como para determinar qué compuestos son los responsables de la estimulación observada sobre IL-6. Así por ejemplo, la catequina y la nicotinamida (compuestos identificados en el extracto de *Cucurbita ficifolia*) se han reportado con

implicaciones en el metabolismo de lípidos; además, la nicotinamida previene el daño hepático por acumulación de ácidos grasos (Mochizuki y Hasegawa, 2004; Varela-Rey *et al.*, 2010).

Aunque en los adipocitos incubados con glucosa 25 mM se esperaba que la activación de PKB estuviera disminuida, lo cual nos podría sugerir cambios en la señalización de la insulina, esto no fue observado. Existe la posibilidad de que esta vía no se encuentre alterada debido a que los niveles de adiponectina aún se encuentran normales. Esta adipocina puede sensibilizar la acción de la insulina y es importante por su efecto antiinflamatorio (Robinson *et al.*, 2011). Por lo tanto, adiponectina estaría protegiendo al adipocito del efecto inflamatorio de TNF- α e IL-6.

Por otra parte, los tratamientos con el extracto y con DQI a las 24 h de incubación solamente presentaron una tendencia a incrementar la fosforilación de PKB dependiente de insulina, aunque sí se observa un aumento en su activación a los 30 min de incubación con DQI solo sin estímulo de insulina, lo cual demuestra el efecto insulinomimético de este compuesto, ya reportado en fibroblastos. En estos estudios, el DQI (0.1-1 mM) aumentó la translocación de GLUT-4 y, por lo tanto, la incorporación de glucosa (Yap *et al.*, 2007), indicando que el mecanismo de acción del DQI sobre la señalización de la insulina es rápido, disminuyendo a tiempos de incubación más largos, como los utilizados en este estudio (24 h). Es importante mencionar que *Cucurbita ficifolia* no tiene el mismo efecto insulinomimético del DQI, lo cual nos indica que el extracto puede actuar por un

mecanismo hipoglucemiante diferente en los adipocitos 3T3-L1. Pero aún no podemos descartar que el DQI pueda ser responsable del efecto hipoglucemiante del extracto de *Cucurbita ficifolia*, debido a que se ha descrito que este compuesto también puede actuar como segundo mensajero. El DQI es componente de los inositol fosfoglicanos, importantes mediadores de la acción de la insulina (Kawa *et al.*, 2003), teniendo relación con la formación del segundo mensajero PIP3, así como con la activación de las enzimas glucógeno sintasa y piruvato deshidrogenasa (Larner *et al.*, 2010). Pero este mecanismo aún no se ha explorado con el DQI presente en el extracto. Aunque otros estudios sugieren que *Cucurbita ficifolia* podría desempeñar un papel importante en la función del páncreas al incrementar el número de islotes y en la expresión y secreción de insulina (García-González, 2011; Miranda-Pérez, 2012).

9. Conclusiones

1. Además del DQI en el extracto de *Cucurbita ficifolia* se encuentran otros compuestos antioxidantes identificados como (±)-catequina, L-ácido ascórbico, ácido p-cumárico, ácido gálico y nicotinamida.
2. Las alteraciones presentadas en el estado redox de las células incubadas con glucosa 25 mM fueron disminuidas por el extracto de *Cucurbita ficifolia* y el DQI, al incrementar la actividad de GPX, incrementando la concentración de GSH y GSSG y restaurando la relación GSH/GSSG, con disminución en la concentración de H₂O₂.
3. El DQI presentó efecto antiinflamatorio al disminuir la expresión del RNAm y la secreción de TNF- α , IL6 y resistina.
4. *Cucurbita ficifolia* disminuyó resistina pero incremento IL-6 en los adipocitos incubados con glucosa 25 mM. Por lo tanto, el extracto debe contener otros compuestos que pueden estar modulando la secreción de esta citocina.
5. Los resultados del presente trabajo sugieren que los tratamientos con *Cucurbita ficifolia* y DQI podrían disminuir las complicaciones provocadas por el estrés oxidativo, evitando la inflamación característica de la obesidad y la DT2.
6. El efecto antiinflamatorio del DQI es un resultado inédito, que se presenta en adición a su efecto insulinomimético, lo cual podría coadyuvar al tratamiento de estas dos patologías.

10. Perspectivas

1. Determinar si el extracto de *Cucurbita ficifolia* induce la translocación de GLUT4.
2. Demostrar la participación del DQI en el efecto hipoglucémico de *Cucurbita ficifolia* por su acción como segundo mensajero.
3. Identificar si se encuentran presentes en el extracto de *Cucurbita ficifolia*, cucurbitacinas, compuestos con efecto antiinflamatorio que se han identificado en la familia de las cucurbitáceas.
4. Determinar los compuestos en *Cucurbita ficifolia* responsables del incremento de IL-6 e investigar si este efecto se relaciona con la acumulación de tejido adiposo en un modelo de obesidad *in vivo*.

11. Esquema de las conclusiones y perspectivas del extracto de *Cucurbita ficifolia* y DQI

En la Figura 23 se muestra el mecanismo propuesto sobre el efecto antioxidante de DQI sintético y el extracto de *Cucurbita ficifolia*. En el cual se muestra como participarían los compuestos antioxidantes identificados en el extracto, como el DQI, (±)-catequina, L-ácido ascórbico, ácido p-cumárico y ácido gálico. Debido a su función en la reducción de radicales libres, como el radical $O_2^{\bullet-}$, proponemos que la cantidad de H_2O_2 disminuye a través de la reducción del radical $O_2^{\bullet-}$. La disminución del H_2O_2 , a su vez, estimula la actividad de la GPX y restablece el estado redox a través de la relación GSH/GSSG. Por su parte, la nicotinamida encontrada en el extracto también participaría en el efecto antioxidante por ser precursora de $NADP^+$ que, junto con $NADPH + H^+$, tienen una función importante en la vía del glutatión, específicamente sobre la actividad de la GR. Además la disminución del H_2O_2 promovida por el extracto y el DQI sintético bloquearía la expresión y secreción de $TNF-\alpha$, IL-6 y resistina. Aunque el extracto podría funcionar por medio de un mecanismo alternativo antiinflamatorio, en el que participarían otros compuestos como las cucurbitacinas que probablemente estén presentes en el extracto. También es importante determinar el o los compuesto (s) responsable (s) del incremento de IL-6 y proponemos que este incremento podría tener un efecto sobre el metabolismo de lípidos, lo que ha sido demostrado para otros compuestos, por ejemplo (±)-catequina (la cual fue identificada en el extracto). Además, nuestro interés en el estudio de la nicotinamida presente en el

extracto de *Cucurbita ficifolia* se debe a que se ha reportado efecto hipoglucémico, en adición a su efecto antioxidante.

El DQI sintético mostró un efecto insulino mimético al activar PKB en los adipocitos, no observándose dicho efecto con el extracto de *Cucurbita ficifolia*. Aún sigue faltando determinar la participación del DQI en el extracto como segundo mensajero.

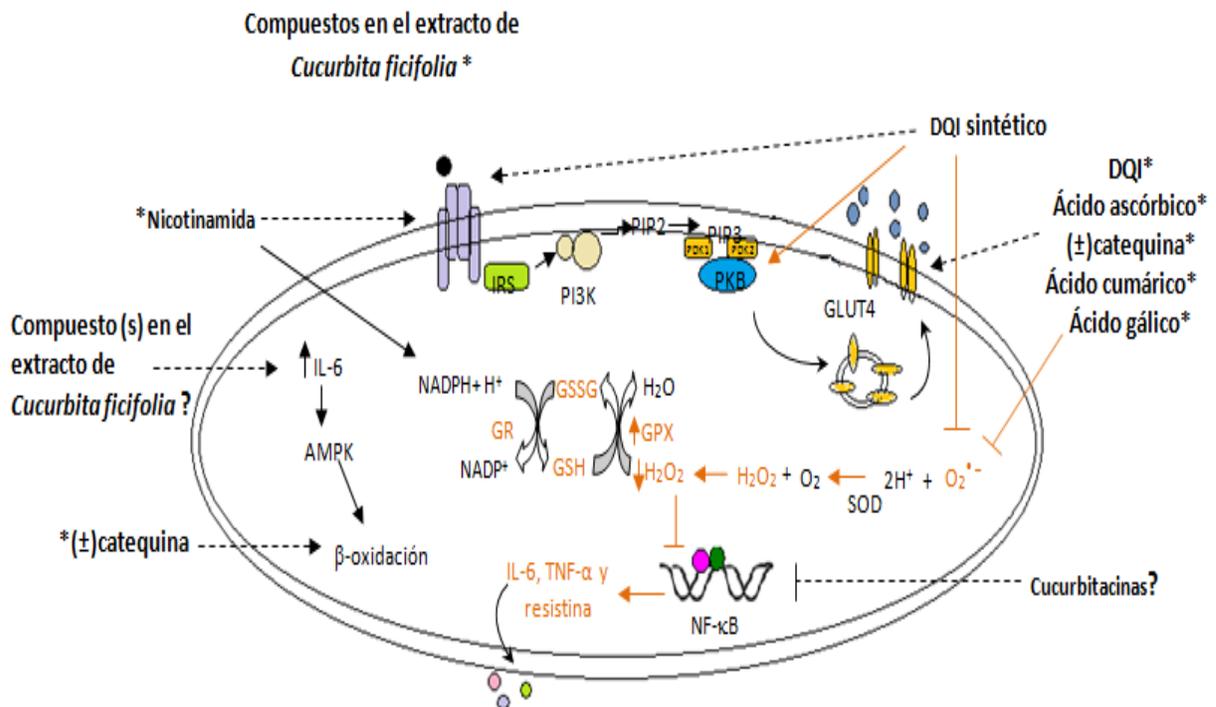


Figura 23. Posibles efectos de los compuestos identificados en el extracto de *Cucurbita ficifolia* y del DQI sintético en los adipocitos. Las líneas, flechas y letras en color anaranjado, representan la vía que se investigó en el presente estudio y la propuesta relacionada con las acciones antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos identificados en el extracto y el DQI sintético.

Aún falta identificar y estudiar otros compuestos que posiblemente se encuentran en el extracto, los cuales también pudieran contribuir a los efectos antiinflamatorio, hipoglucémico y aquellos que promueven el incremento de IL-6.

-----► -----| No se conocen totalmente el mecanismo por el cual actúa el compuesto.

12. Bibliografía

Abdelwahab SI, Hassan LE, Sirat HM, Yagi SM, Koko WS, Mohan S, Taha MM, Ahmad S, Chuen CS, Narrima P, Rais MM, Hadi AH. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. citroides: role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia* 2011; 82(8):1190-1197.

Acosta JL, Jiménez E, Juárez MA, Díaz JC. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J Ethnopharmacol* 2001; 77(1): 99-101.

Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 2005; 99(3): 325-348.

Alarcon FJ, Hernandez E, Campos AE, Xolalpa S, Rivas JF, Vazquez LI, Roman R. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol* 2002; 82(2-3): 185-189.

Bahar B, O'Doherty JV, Sweeney T. A potential role of IL-6 in the cholesteryl ester-mediated inhibition of adipogenesis. *Br J Nutr* 2011; 106(8): 1142-1153.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17(1): 4-12.

Bauer S, Wanninger J, Schmidhofer S, Weigert J, Neumeier M, Dorn C, Hellerbrand C, Zimara N, Schäffler A, Aslanidis C, Buechler C. Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes. *Endocrinology* 2011; 152(1): 26-35.

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012; 142:w13659.

Bunn RC, Cockrell GE, Ou Y, Thrailkill KM, Lumpkin CK Jr, Fowlkes JL. Palmitate and insulin synergistically induce IL-6 expression in human monocytes. *Cardiovasc Diabetol* 2010; 9: 73.

Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules* 2010; 16(1): 251-280.

Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med* 2010; 25(2): 119-129.

Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(3): 349-356.

Díaz-Flores M, Angeles Mejia S, Baiza-Gutman LA, Medina-Navarro R, Hernández-Saavedra D, Ortega-Camarillo C, Roman-Ramos R, Cruz M, Alarcón Aguilar FJ. Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *J Ethnopharmacol* 2012; 144(1): 101-108.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signalling. *J Biol Chem* 2000; 275(21): 15985-15991.

Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002; 106(16): 2067–20672.

Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(7-8): 1040-1052.

Evans JL. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance?. *Indian J Med Res* 2007; 125(3): 355-372.

Farias VX, Macêdo FH, Oquendo MB, Tomé AR, Bão SN, Cintra DO, Santos CF, Albuquerque AA, Heimark DB, Larner J, Fonteles MC, Leal-Cardoso JH, Nascimento NR. Chronic treatment with D-chiro-inositol prevents autonomic and somatic neuropathy in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* 2011; 13(3): 243-250.

Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Nieto-Vazquez I, Lorenzo M. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin

resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(9): 3583-3593.

Flora SJ. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longv* 2009; 2(4): 191-206.

Fortis-Barrera A. Efecto de un extracto de *Cucurbita ficifolia* Bouché sobre los niveles de citocinas proinflamatorias en ratones obesos. Tesis de Maestría en Biología Experimental 2007; Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Fresno M, Alvarez R, Cuesta N. Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch Physiol Biochem* 2011; 117(3): 151-164.

Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Metab (Lond)* 2006; 3:28.

Galinier A, Carrière A, Fernandez Y, Carpéné C, André M, Caspar-Bauguil S, Thouvenot JP, Periquet B, Pénicaud L, Casteilla L. Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. *J Biol Chem* 2006; 281(18): 12682-12687.

García-González J. Proliferación de células β pancreáticas en ratones diabéticos tratados con *Cucurbita ficifolia* Bouché. Tesis de Maestría en Biología Experimental 2011; Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 2002; 277(50): 48115-48121.

Gariballa S , Afandi B , Abuhaltam M , J Yassin , Habib H , W Ibrahim . Oxidative damage and inflammation in obese diabetic Emirati subjects supplemented with antioxidants and B-vitamins: a randomized placebo-controlled trail. *Nutr Metab (Lond)* 2013; 10(1): 21

Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(9-10): 922-935.

Gutierrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernandez S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martinez M, Hernandez-Avila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, Mexico: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.

Haluzik MM, Lacinova Z, Dolinkova M, Haluzikova D, Housa D, Horinek A, Vernerova Z, Kumstyrova T, Haluzik M. Improvement of insulin sensitivity after peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment is accompanied by paradoxical increase of circulating resistin levels. *Endocrinology* 2006; 147(9): 4517-4524.

Hansberg W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. 2002. <http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Ciencia* 1993; 259(5091): 87-91.

Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett* 2003; 189(1): 11-16.

Jurikova T, Rop O, Mlcek J, Sochor J, Balla S, Szekeres L, Hegedusova A, Hubalek J, Adam V, Kizek R. Phenolic profile of edible honeysuckle berries (genus *Lonicera*) and their biological effects. *Molecules* 2011; 17(1): 61-79.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116(7): 1784-1792.

Kawa JM, Przybylki R, Taylor CG. Urinary chiro-inositol and myo-inositol excretion is elevated in the diabetic db/db mouse and streptozotocin diabetic rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228(8): 907-914.

Kobayashi H, Matsuda M, Fukuhara A, Komuro R, Shimomura I. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(6): E1326-1334.

Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: The good, the bad, or the indifferent?. *Diabetes* 2005; 54: S114-124.

Larner J, Brautigan DL, Thorner MO. D-chiro-inositol glycans in insulin signaling and insulin resistance. *Mol Med* 2010; 16(11-12): 543-552.

Larner J. D-chiro-inositol--its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. *Int J Exp Diabetes Res* 2002; 3(1): 47-60.

Lee YS, Kim AY, Choi JW, Kim M, Yasue S, Son HJ, Masuzaki H, Park KS, Kim JB. Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol* 2008; 22(9): 2176-2189.

Li W, Dai RJ, Yu YH, Li L, Wu CM, Luan WW, Meng WW, Zhang XS, Deng YL. Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(6): 1123-1129.

Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, Scherer PE. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005; 280(6): 4617-4626.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30(1-2): 42-59.

Luo Z, Zhang Y, Li F, He J, Ding H, Yan L, Cheng H. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine* 2009; 36(1): 60-69.

Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The vitamin nicotimide: translating nutrition into clinical care. *Molecules* 2009; 14(9): 3446-3485.

Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* 2009; 157(7): 1097-10110.

Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SM. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis* 2012; 11:30.

McCord JM. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose Response* 2008; 6(3): 223-38.

Mendivil CO, Sierra ID. Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. Rev Fac Med Univ Nac Colomb 2005; 53(4): 235-243.

Michel RH. Inositol derivatives: evolution and functions. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9(2): 151-161.

Miranda-Pérez E. Estudio de *Cucurbita ficifolia* Bouché e *Ibervillea sonora* Greene como secretagogos de insulina en células RINm5F. Tesis de Maestría en Biología Experimental 2012; Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Mochizuki M, Hasegawa N. Sterospecific effects of catechin isomers on insulin induced lipogenesis in 3T3-L1 cells. Phytother Res 2004; 18(6): 449-550.

Nascimento NR, Lessa LM, Kerntopf MR, Sousa CM, Alves RS, Queiroz MG, Price J, Heimark DB, Lerner J, Du X, Brownlee M, Gow A, Davis C, Fonteles MC. Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(1): 218-223.

Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(11): 1287-312.

Novelli M, Bonamassa B, Masini M, Funel N, Canistro D, De Tata V, Martano M, Soleti A, Campani D, Paolini M, Masiello P. Persistent of hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic by a non-conventional radical scavenger . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; 382(2):127-137.

Naudi A, Jove M, Ayala V, Cassanye A, Serrano J, Gonzalo H, Boada J, Prat J, Portero-Otin M, Pamplona R. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012:696215.

Olivares JA, Arellano A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB* 2008; 27: 9-18.

OMS. Organización mundial de la Salud. Consulta 13 de junio 2013.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.

Park J, Choe SS, Choi AH, Kim KH, Yoon MJ, Suganami T, Ogawa Y, Kim JB. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. *Diabetes* 2006; 55(11): 2939-2949.

Qiao J, Xu LH, He J, Ouyang DY, He XH. Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF- κ B nuclear translocation. *Inflamm Res* 2013; 62(5): 461-469.

Robinson K, Prins J, Venkatesh B. Clinical review: adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit Care* 2011; 15(2): 221.

Roman R, Alarcón FJ, Lara A, Flores JL. Hypoglycemic activity of some antidibetic plants. *Arch Med Res* 1992; 23(3): 105-109.

Roman-Ramos R, Almanza-Perez JC, Fortis-Barrera A, Angeles-Mejia S, Banderas-Dorantes TR, Zamilpa-Alvarez A, Diaz-Flores M, Jasso I, Blancas-Flores G, Gomez J, Alarcon-Aguilar FJ. 2012. Antioxidant and anti-Inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in streptozotocin-induced diabetes mice. *Am J Chin Med* 2012; 40(1): 97-110.

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212(2): 167-178.

Sauve AA. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324(3): 883-893.

Schinner S, Scherbaum W A, Bornstein S R, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med* 2005; 22(6): 674-682.

Senn J, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) a potential mediator of interleukin-6 dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 2003; 278(16): 13740-13746.

Sethi G, Ahn KS, Sung B, Aggarwal BB. Pinitol targets nuclear factor-KB activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(6): 1604-1614.

Steinberg GR. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle* 2007; 6(8): 888-894.

Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, Bokarewa MI. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. *J Cell Mol Med* 2010; 14(6B): 1419-1431.

Tataranni PA, Ortega E. Does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes?. *Diabetes* 2005; 54: 917-927.

Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT-4 translocation. *J Biol Chem* 1999; 274(15):10595-602.

Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Rogero MM, Tirapegui J. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochem Funct* 2010; 28(8): 623-631.

Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carolla AM, Armstrong D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001; 154(4): 348-356.

Van Cromphaut SJ. Hyperglycaemia as part of the stress response: the underlying mechanisms. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2009; 23(4): 375-386.

Varela-Rey M, Martínez-López N, Fernández-Ramos D, Embade N, Calvisi DF, Woodhoo A, Rodríguez J, Fraga MF, Julve J, Rodríguez-Millán E, Frades I, Torres L, Luka Z, Wagner C, Esteller M, Lu SC, Martínez-Chantar ML, Mato JM. Fatty liver and fibrosis in glycine methyltransferase knockout mice is prevented by nicotinamide. *Hepatology* 2010; 52(1): 105-114.

Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002; 8(1): 75-79.

Witkowski A, Konopa J. Binding of the cytotoxic and antitumor triterpenes, cucurbitacins, to glucocorticoid receptors of HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1981; 674(2): 246-55.

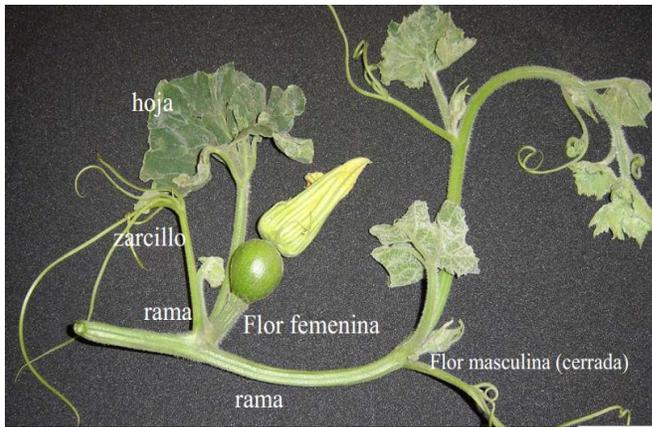
Wolsk E, Mygind H, TS Grøndahl, BK Pedersen, van Hall G. IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299 (5): E832-840.

Xia T, Wang Q. D-quirositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats. *J. Pharm Pharmacol* 2006; 58(11): 1527-1532.

Yap A, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. Rat L6 myotubes as *in vitro* model system to study dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology* 2007; 55(2-3): 103-108.

13. Anexo

Cucurbita ficifolia Bouché



INFORMACIÓN TAXONÓMICA

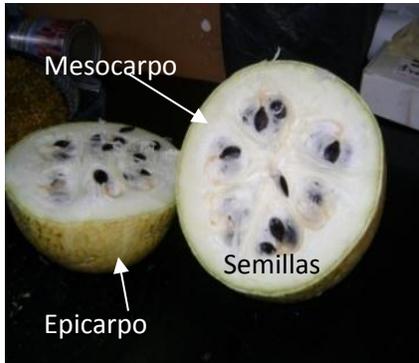
REINO: Plantae
DIVISIÓN: Magnoliophyta
CLASE: Magnoliopsida
ORDEN: Violales
FAMILIA: Cucurbitaceae
GÉNERO: *Cucurbita*
ESPECIE: *ficifolia* Bouché

Planta de *Cucurbita ficifolia*. Se muestra la hoja, tallo y flor.¹

Descripción botánica

Cucurbita ficifolia es una planta rastrera o trepadora, monoica y anual. Esta planta presenta raíces primarias y adventicias fibrosas. Los tallos de *Cucurbita ficifolia* son vigorosos ligeramente anguloso-sulcados, ligeramente puberulentos, hirsutos o hispídos, armados con agujones cortos, punzantes, escasos y pelos glandulares.² Las hojas de esta planta tienen pecíolos de 5-25 cm; ovado cordadas a suborbicular-cordadas, con o sin manchas blancas en el haz, 3-5 lobuladas, con lóbulos redondeados u obtusos. Además, sus flores son monoicas; las flores masculinas largamente pedunculadas, el cáliz es un tubo cortamente acampanado, de hasta 1 cm de largo; la corola amarilla a anaranjado-pálida, de hasta 12 cm de largo; con 3 estambres con las anteras lineares y unidas entre sí formando un cuerpo cónico o cilíndrico. Las flores femeninas son similares, a

veces un poco más grandes, con un estilo engrosado y 3 estigmas lobadas; se observa el ovario ínfero.^{3,4,5}



Fruto de *Cucurbita ficifolia*.

Los frutos de *Cucurbita ficifolia* son globosos, ovado-elípticos u obovoides (20-35 cm de largo), el epicarpo (cáscara) es rígido, persistente, sin costillas, densa y diminutamente ondulado, blanco-amarillento, verde claro u oscuro, verde con franjas blancas longitudinales hacia el ápice o con diminutas manchas blancas y verdes; el mesocarpo (pulpa) es blanco, granuloso-fibroso, dulce, con placentas largas y delgadas.² Mientras que las semillas son de forma ovado-elípticas comprimida (14-25 x 7-12 mm) y su color es pardo oscuras a negras o blanco-crema.^{3,5}

Aspectos ecológicos y fitogeográficos

La planta de *Cucurbita ficifolia* se encuentra ampliamente distribuida bajo cultivo desde los 1 000 hasta casi los 3 000 m de altitud, en prácticamente todas las cordilleras de América Latina. La restricción del cultivo en zonas de notable altitud es un carácter distintivo de *Cucurbita ficifolia*, respecto a las otras especies cultivadas del género, que en general pueden crecer en un rango más amplio de condiciones ecológicas (para *Cucurbita pepo* y *C. moschata*, desde 8 m hasta 2 300 m).³ En México es una planta cultivada en Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Veracruz.⁴

Bibliografía.

1. Zaccari F. *Cucurbita sp.* Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Consulta Octubre 2013
<http://www.fagro.edu.uy/horticultura/CUCURBITACEAS/Fisiologia.pdf>
2. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM), Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO). *Cucurbita ficifolia*. Royal Botanic Gardens, Kew. Consulta Octubre 2013
<http://www.kew.org/searchepic/summaryquery.do?searchAll=true&scientificName=Cucurbita+ficifolia>
3. Lira R, Montes S. La agricultura en Mesoamérica. *Cucúrbitas*. Consulta Octubre 2013
http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_3.htm#auto
4. Heike V. 2009. Malezas de México. Consulta Octubre 2013
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cucurbitaceae/cucurbita-ficifolia/fichas/ficha.htm#5>. Biología y ecología
5. Lira R, Rodríguez A. 1999. Cucurbitaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 22. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México