



POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE *Cucurbita ficifolia* SOBRE LA VÍA REDOX DE GSH EN
DIABETES EXPERIMENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A
SELENE ÁNGELES MEJÍA

COMITÉ TUTORAL

Directores:

Dra. MARGARITA DÍAZ FLORES
Dr. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR

Asesor:

Dr. MIGUEL CRUZ LÓPEZ

Comité Tutorial

Co-Director: Dra. Margarita Díaz Flores

Investigadora Asociada D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI

Co-Director: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C

Laboratorio de Farmacología
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Miguel Cruz López

Investigador titular A

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI

Este trabajo fue realizado en la UIM en Bioquímica, Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, en colaboración con el Laboratorio de Farmacología, UAM-Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Margarita Díaz Flores y el Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar, y con la asesoría del Dr. Miguel Cruz López.

La maestría en Biología Experimental de la UAM-I se encuentra dentro del padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) con número de registro UAM-I:309-1 y clave del Programa PIFOP-CONACyT-SEP C-PFPN-2002-35-32.

Este trabajo se llevó a cabo parcialmente con los recursos del CONACyT bajo el programa de Apoyo Complementario a investigadores en Proceso de Consolidación (APOY.COMPL-2008, convenio 90213).

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada con número de registro (CVU/becario) 229583; 229583/212822 y al IMSS por el apoyo económico brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca con número de registro 99094417.

Agradecimientos

A la Dra. Margarita Díaz Flores

Por ser mi maestra, por guiarme sin condiciones y apoyarme a todo momento, además de ser una mujer maravillosa, inteligente y un ejemplo a seguir.

Gracias Dr. Margarita

A los Doctores Francisco J. Alarcón Aguilar y Miguel Cruz López

Por el apoyo y manejo del trabajo.

Al comité tutorial

Dr. Rubén Román Ramos, Dr. Miguel Cruz López, Dr. Clara Ortega Camarillo y Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Por sus acertadas sugerencias en la revisión de éste trabajo.

A mis amigos de laboratorio de Farmacología

Ángeles, Tania, Ivan, Gabi, Gerarado, Julio y Jessica.

Por apoyarme en la elaboración del trabajo y compartir juntos la etapa tan emotiva de ser estudiante.

A mis amigos de la Unidad de Investigación en Bioquímica

Nayeli, Sonia, Yony, Hilda, Fernanda y Javier.

Por sus consejos, apoyo y amistad.

Dedicatorias

A Beto

*Especialmente por ser mi esposo y caminar juntos por un mismo destino
Por apoyarme en todas las situaciones de felicidad, tristezas y dificultades en las que nos hemos
visto implicados.*

*Te doy las gracias por compartir cada minuto de tu vida con la mía.
Por ser el gran amor de mi vida*

*A mi nueva familia, mi suegro Sabino, mis cuñados Maty, Sofi, Hilda y José Adrián, mis
sobrinos Miguel, Luz Vianeth y Luz Lizeth
Por aceptarme en su familia, por todo el apoyo y comprensión en las cosas buenas y malas en las
que hemos caminado juntos.*

*A mis padres
Fran y Luis
Por todo su apoyo, amor y comprensión
Por dedicarme su tiempo, atención y regalarme la vida.*

*A Yazmin
Por ser mi hermana, cómplice y amiga.
Con gratitud y cariño*

*A Itzel
Por acompañarme en el largo camino de la vida, estando siempre juntas.
Con cariño*

*A mi abuelita Paz
Por ser la guía de la casa
Con gratitud, respeto y cariño*

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 la vía redox de GSH en diabetes experimental”.

Jurado de Examen

Presidente

Dr. Rubén Román Ramos
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario

Dr. Miguel Cruz López
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Vocal

Dra. Clara Ortega Camarillo
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Vocal

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Laboratorio en Biología del Desarrollo,
Unidad de Morfología FES-Iztacala, UNAM.

ÍNDICE

	Páginas
Resumen -----	I
Abstract -----	III
Índice de tablas -----	V
Índice de figuras-----	VI
1. Introducción -----	1
1.1. Generalidades, definición y clasificación de la diabetes mellitus -----	1
1.1.1 Diabetes experimental -----	2
1.1.2 Citotoxicidad de la estreptozotocina -----	3
1.2. Antecedentes -----	4
1.2.1. Radicales libres -----	5
1.2.2. Clasificación de los radicales libres -----	5
1.2.3. Origen de las especies reactivas de oxígeno -----	6
1.2.4. Sistemas antioxidantes -----	7
1.2.5. Estrés oxidativo en las complicaciones de la diabetes -----	7
1.2.6. Alteración de la vía redox del glutatión en diabetes -----	11
1.2.7. La medicina tradicional en las complicaciones de la diabetes mellitus --	13
2. Planteamiento -----	14
3. Justificación -----	15
4. Hipótesis -----	15
5. Objetivos -----	16
5.1. Objetivo general -----	16
5.2. Objetivos particulares -----	16
6. Material y Método -----	16
6.1. Materiales -----	16
6.1.1. Productos y reactivos -----	16

6.1.2. Aparatos e instrumental -----	16
6.1.3. Animales de experimentación -----	17
6.1.4. Diabetes experimental -----	17
6.1.5. Extracto de <i>Cucurbita ficifolia</i> -----	17
6.1.6. Tratamientos y obtención de tejidos -----	18
6.2. Métodos -----	18
6.2.1. Determinación de glucosa -----	18
6.2.2. Determinación de GSH -----	19
6.2.3. Determinación de GSSG -----	19
6.2.4. Actividades de GPx y GR -----	20
6.2.5. Método para cuantificar TBARS -----	21
6.2.6. Determinación de proteínas totales -----	22
6.2.7. Análisis estadísticos -----	22
7. Resultados -----	23
7.1. Características generales de los animales tratados -----	23
7.2. Efecto de <i>Cucurbita ficifolia</i> y pioglitazona sobre la concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG -----	24
7.3. Cambios de las actividades de GPx y GR por <i>Cucurbita ficifolia</i> y pioglitazona en los ratones con diabetes experimental -----	30
7.4. Efecto de <i>Cucurbita ficifolia</i> y pioglitazona sobre el grado de lipoperoxidación-----	35
8. Discusión y Conclusión -----	36
9. Bibliografía -----	42

Resumen

La hiperglucemia crónica es el principal factor que determina el desarrollo de las lesiones diabéticas, ya que conlleva a una condición oxidante alterando la relación de la forma reducida y oxidada del glutatión (GSH/GSSG). Mantener esta relación depende de un ciclo de óxido-reducción, a través del cual se metabolizan peróxidos orgánicos e inorgánicos y se conservan las concentraciones de GSH. En la diabetes la relación se encuentra alterada, contribuyendo de manera importante a la génesis de las complicaciones diabéticas. Una alternativa para reducir la condición oxidante y mejorar la relación GSH/GSSG pudiera ser el extracto de *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae), debido a sus propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes.

El objetivo del estudio fue determinar las propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes de *Cucurbita ficifolia* Bouché y pioglitazona en ratón diabético inducido con estreptozotocina. El modelo experimental consistió en ratones macho de la cepa CD-1 distribuidos al azar en 4 grupos; control normal, control diabetes experimental (estreptozotocina, 175 mg/Kg), diabetes experimental más *Cucurbita ficifolia* (200 mg/Kg equivalente a 0.75 mg de *D*-quiro inositol) y diabetes experimental más pioglitazona (0.64 mg/Kg). Al término de los tratamientos (30 días) se obtuvo sangre total para determinar las concentraciones de glucosa y TBARS, y se extrajeron fragmentos de hígado, páncreas, riñón y corazón para las determinaciones de GSH, GSSG, la relación GSH/GSSG y las actividades de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa; así como para determinar proteínas.

El grupo con diabetes experimental presentó las concentraciones de glucosa en sangre más altas de los grupos evaluados, asociada con polidipsia y polifagia. Los tratamientos con *Cucurbita ficifolia* y pioglitazona disminuyeron la hiperglicemia en un 78 y 68%, respectivamente; en el primer caso se llegó a valores cercanos al control. Además de reducirse significativamente el consumo de agua y alimento.

En los tejidos hígado y riñón de los grupos diabetes experimental y el tratado con pioglitazona mostraron decrementos de GSH y aumentos de GSSG, lo que redujo la relación GSH/GSSG, con respecto al control. En el grupo diabético, a pesar que en páncreas y corazón no se observaron cambios en GSH, si aumentó en ellos GSSG, reduciéndose las relaciones GSH/GSSG con respecto al control. El tratamiento con *Cucurbita ficifolia* en hígado, páncreas y riñón aumentó GSH, disminuyó GSSG y, aumentó la relación GSH/GSSG significativamente con respecto al grupo diabetes experimental. En el caso del corazón, *Cucurbita ficifolia* no indujo cambios en esta relación.

Por su parte las actividades de GPx y GR en hígado, páncreas y riñón de los grupos diabetes experimental y el tratado con pioglitazona se encontraron incrementadas significativamente con respecto al control. *Cucurbita ficifolia* restauró ambas actividades a valores cercanos al control. En el caso del corazón, exclusivamente pioglitazona decreció significativamente GPx y GR, respecto al grupo diabetes experimental

En cuanto al grado lipoperoxidación, evaluado por TBARS en plasma, fue mayor en el grupo de diabetes experimental de todos los grupos estudiados. El tratamiento con *Cucurbita ficifolia* y/o pioglitazona decrece las concentraciones de TBARS en 6.7 y 1.97 veces respectivamente cuando se comparan con el grupo diabetes experimental.

En conclusión, nuestros resultados confirman que la administración oral del extracto de *Curcubita ficifolia* tiene efectos hipoglucemiante y antioxidante. Como hipoglucemiante, a reserva de ser confirmado en un futuro, al estimular la liberación del péptido 1 análogo del glucagon GLP1 o como inhibidor de glucosidasas. En cuanto a la propiedad antioxidante pudiera atribuirse al *D*-quiro inositol, hidroxifenol que metaboliza especies reactivas de oxígeno. Ambas propiedades repercuten para que la vía redox del GSH trabaje con eficiencia.

Abstract

Chronic hyperglycemia is the main factor determining the development of diabetic lesions, since it implies a condition altering the ratio of oxidizing the reduced form and oxidized glutathione (GSH / GSSG). Maintaining this relationship depends on a redox cycle, through which metabolize organic and inorganic peroxides and preserved GSH concentrations. In diabetes the relationship is impaired, contributing significantly to the genesis of diabetic complications. An alternative to reduce oxidative status and improving the relationship GSH / GSSG might be the extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae), due to their hypoglycemic and antioxidant properties.

The objective was to determine the hypoglycemic and antioxidant properties of *Cucurbita ficifolia* Bouché and pioglitazone in diabetic mice induced with streptozotocin. The experimental model consisted of male mice CD-1 strain were randomly assigned into 4 groups: normal control, control experimental diabetes (streptozotocin 175 mg / Kg), *Cucurbita ficifolia* more experimental diabetes (200 mg / Kg equivalent to 0.75 mg *D*-chiro inositol) and more experimental diabetes pioglitazone (0.64 mg / Kg). At the end of treatment (30 days) was obtained to determine whole blood glucose concentrations and TBARS, and fragments were extracted from liver, pancreas, kidney and heart for the determinations of GSH, GSSG, the ratio GSH / GSSG and activities glutathione peroxidase and glutathione reductase.

The experimental group presented with diabetes blood glucose concentrations higher rated groups associated with polydipsia and polyphagia. Treatment with pioglitazone decreased *Cucurbita ficifolia* and hyperglycemia in 78 and 68%, respectively, in the first case it was close to control values. In addition to significantly reduced water and food consumption.

In liver and kidney tissues of experimental groups and diabetes treated with pioglitazone showed decreases of GSH and GSSG increases, reducing the ratio GSH / GSSG, with respect to control. In the diabetic group, although in pancreas and heart showed no

changes in GSH, GSSG if they increased, reducing the relationships GSH / GSSG with respect to control. *Cucurbita ficifolia* treatment in liver, pancreas and kidney increased GSH, GSSG decreased and increased the ratio GSH / GSSG significantly from the experimental diabetes group. In the case of the heart, *Cucurbita ficifolia* induced no changes in this relationship.

For its part the activities of GPx and GR in liver, pancreas and kidney of experimental diabetic groups and were treated with pioglitazone significantly increased over control. *Cucurbita ficifolia* restored both activities to near control values. In the case of the heart, only pioglitazone significantly decreased GPx and GR, for the experimental diabetes group

Regarding the degree lipoperoxidation, evaluated by TBARS in plasma was higher in the experimental diabetes group all groups studied. *Cucurbita ficifolia* treatment and / or pioglitazone decreased concentrations of TBARS in 6.7 and 1.97 times respectively when compared with the experimental diabetes group.

In conclusion, our results confirm that oral administration of extract of *Cucurbita ficifolia* hypoglycemic and antioxidant effects. As hypoglycaemic, subject to be confirmed in future by stimulating the release of peptide 1 analog of glucagon or GLP1 as an inhibitor of glucosidases. On the antioxidant property is explained by the *D*-chiro inositol, hydroxyphenol that metabolizes reactive oxygen species. Both properties have an impact for the GSH redox pathway works efficiently.

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Sistema de reacción para determinar la actividad de GR -----	20
Tabla 2. Sistema de reacción para determinar la actividad de GPx -----	21
Tabla 3. Sistema de reacción para determinar TBARS -----	22
Tabla 4. Características generales de los animales con diferente tratamiento -----	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en hígado de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona -----	26
Figura 2. Concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en páncreas de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona -----	27
Figura 3. Concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en riñón de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona -----	28
Figura 4. Concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en corazón de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona-----	29
Figura 5. Actividades de GPx y GR en hígado de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona -----	31
Figura 6. Actividades de GPx y GR en páncreas de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona -----	32
Figura 7. Actividades de GPx y GR en riñón de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona -----	33
Figura 8. Actividades de GPx y GR en corazón de ratones con diabetes experimental tratados con <i>Cucurbita ficifolia</i> o pioglitazona -----	34
Figura 9. Concentración de TBARS en plasma de ratones con diabetes experimental con diferente tratamiento -----	35

I. Introducción

1.1. Generalidades, definición y clasificación de la diabetes mellitus

En la actualidad la diabetes mellitus (DM) plantea un grave problema mundial en salud pública debido al aumento en su incidencia y prevalencia. De acuerdo con la información disponible, México ocupaba el décimo lugar mundial en 1995 con 4 millones de enfermos y se estima que para el 2025 ocupará el séptimo con 12 millones. La Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, realizada en 1993, señaló varios datos de interés sobre el comportamiento de esta enfermedad en el país, destacando que un tercio de las personas que presentan diabetes desconoce que la padece. Por otra parte, la prevalencia de 7.2 por ciento de los enfermos detectados por medio del estudio de glucemia venosa, se incrementó hasta 8.2 por ciento, con la estimación de la curva de tolerancia a la glucosa. Estas cifras alarmantes son producto de cambios en la alimentación y una vida sedentaria, hábitos que también favorecen la incidencia de la enfermedad, la obesidad e intolerancia a la glucosa en los adolescentes. La diabetes describe diferentes trastornos metabólicos que resultan de alteraciones en la secreción de la insulina, en la respuesta periférica a esta hormona o ambas. Esto conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Rivera y col., 2002).

Se han descrito al menos cuatro variedades de la enfermedad, sin embargo, la mayoría de los casos corresponden a diabetes tipo 1 y tipo 2. La diabetes tipo 1 (DT1) se caracteriza principalmente por destrucción de las células- β del páncreas, de manera que la producción de insulina es nula o insignificante. La diabetes tipo 2 (DT2), por su parte, se caracteriza por resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina (Levovitz, 1999). La DT2 es uno de los padecimientos con mayor demanda hospitalaria a nivel mundial y ocupa el primer lugar de incidencia en nuestro país. En los individuos que padecen DT2 el principal defecto en la acción de la insulina se localiza a nivel post-receptor (Saltiel y Khan, 2001). La acción de la hormona se ve alterada por estímulos que inhiben la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) en residuos de serina (Hotamisligil y col., 1994). A su vez, la falta de activación de serina del IRS-1

reduce la fosforilación de tirosina del IRS-1 en respuesta a la insulina, suprimiendo de esta manera la señalización molecular intracitosólica apropiada de esta hormona, causando resistencia a sus acciones (Paz y col., 1997).

El tercer grupo corresponde a otros tipos específicos de diabetes causados por defectos genéticos en la función de las células- β o en la acción de la insulina, por enfermedades del páncreas exocrino, por fármacos o por agentes químicos que las induzcan. Por último la diabetes gestacional, que ocurre durante el embarazo (Committee Report, 1997).

1.1.1. Diabetes experimental

Para el estudio experimental de la diabetes se cuenta con modelos espontáneos o inducidos. Los primeros implican diversas alteraciones genéticas que llevan al desarrollo espontáneo de la enfermedad; mientras que los segundos se inducen experimentalmente (Díaz Flores, 2006). Los modelos espontáneos son relativamente comunes y se presentan en diversas especies, como: ratón, rata, mono, criceto y conejo. En el cerdo, mono, ratón y rata se pueden desarrollar modelos con hiperglucemia moderada o severa, obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Hugués-Hernandorena y col., 2002; Clifford y Flatt, 1988).

En los modelos inducidos, la diabetes se provoca mediante diferentes vías, entre ellas: administración de sustancias químicas, métodos quirúrgicos, lesiones a nivel de hipotálamo ventro-medial, alteraciones dietéticas, inducción hormonal y manipulación genética; en estos modelos se observan trastornos en la biosíntesis, secreción o acción de la insulina (Hugués-Hernandorena y col., 2002). Dentro de los agentes diabetogénicos con mayor demanda están la estreptozotocina y la aloxana, los cuales actúan selectivamente destruyendo a la célula- β del páncreas.

1.1.2. Citotoxicidad de la estreptozotocina

La estreptozotocina (1-metil-1-nitrosourea-2-desoxiglucosa, STZ) está clasificada como un antibiótico derivado de *Streptomyces acromógenes*, con la propiedad de

inducir diabetes experimental en mamíferos. La diabetes inducida por STZ se identifica por alteraciones en las concentraciones de glucosa e insulina sanguínea. Dos horas después del tratamiento, la hiperglucemia se acompaña con una caída en los niveles de insulina. Finalmente hay una hiperglucemia franca con niveles bajos de insulina (West y col., 1996). Estos cambios son reflejo del daño en la función de las células- β del páncreas.

La STZ es una sustancia relativamente selectiva para la célula- β pancreática debido a que se une al transportador de glucosa 2 (GLUT2), presente en su membrana; éste reconoce el residuo de glucosa de la molécula de STZ, facilitando su entrada (Delaney y col., 1995; Elsner y col., 2000), de tal forma que la reducción en la expresión de GLUT2 previene la acción diabetogénica de STZ (Shnedl y col., 1994). El blanco de acción de la STZ es el DNA de la célula- β del páncreas, se atribuye a dos mecanismos: primero por ser un agente alquilante muy potente, propiedad que le confiere el residuo 1-metil-1nitrosourea, que alquila y fragmenta al DNA, especialmente en la posición O⁶ de la guanina (Elsner y col., 2000); el segundo está mediado por la producción de óxido nítrico. La STZ no es un donador espontáneo de óxido nítrico (NO \cdot); éste se libera cuando se metaboliza, sin que sea requerida la actividad catalítica de óxido nítrico sintasa para este efecto. Durante la acción de la STZ se ha confirmado que el NO \cdot contribuye a la destrucción de los islotes pancreáticos, exacerbando el daño al DNA. Su participación se ha demostrado debido a que ocurren cambios similares a los originados por NO \cdot , como el aumento en la actividad de la guanilato ciclasa y en las concentraciones de GMPc.

El uso de inhibidores de la óxido nítrico sintasa contrarrestan parcialmente la fragmentación de DNA inducida por STZ; un efecto similar se obtiene con atrapadores del NO \cdot (Durán-Reyes y col., 2004). La STZ también genera especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales lesionan al DNA y provocan otros cambios deletéreos en las células. La formación del anión superóxido (O₂ \cdot^-), precursor de ERO en la mitocondria, es inducida por la STZ, debido a que al inhibir el ciclo de Krebs decrece el consumo de oxígeno en la mitocondria, limitando la producción de ATP y causando la caída de este

nucleótido en las células-β. La restricción del ATP es mediada parcialmente por el NO[•], el cual al unirse con el Fe²⁺ presente en la aconitasa, inhibe su actividad enzimática (Welsh y Sandler, 1994).

La desfosforilación del ATP aumenta la disponibilidad del sustrato para la xantina oxidasa (enzima con actividad alta en la célula-β) y la producción de ácido úrico, producto final de la degradación del ATP. La xantina oxidasa cataliza la reacción en la cual se forma el O₂^{•-} y de éste derivan el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. La inhibición *in vitro* de la xantina oxidasa por el alopurinol restringe el efecto de STZ. A pesar de que la principal causa de toxicidad de STZ se debe a su propiedad alquilante, también participa la acción sinérgica del NO[•] y ERO, quienes de manera independiente o a través de la formación de peroxinitrito, (ONOO) lesionan al DNA. Como consecuencia de la fragmentación de DNA causado por la STZ, también se activa la poli-ADP-ribosilación (Sandler y Swenne, 1983). Este proceso conlleva a una disminución de NAD⁺ celular, así como del contenido de ATP y la subsecuente caída en la síntesis y secreción de insulina.

1.2. Antecedentes

El estrés oxidativo es ampliamente aceptado como un mediador clave en el desarrollo y progreso de la diabetes y sus complicaciones; deriva del incremento en la producción de radicales libres acoplado con una deficiencia de los sistemas antioxidantes (Ceriello, 2003; Maritim y col., 2003). Actualmente se asocia con la etiología de numerosas enfermedades, destacando: aterosclerosis, Alzheimer, obesidad, síndrome metabólico, hipertensión, y diversos tipos de cáncer, entre otras, constituyendo, así, uno de los mecanismos fisiopatológicos más importantes para explicar diversos procesos morbosos (Drög, 2002).

1.2.1. Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Las formas parcialmente

reducidas del oxígeno se denominan especies reactivas del oxígeno (ERO). Es un término colectivo que incluye, no sólo los radicales del oxígeno, sino también algunos derivados reactivos no radicales del oxígeno. Además de las ERO, también son importantes las especies reactivas del nitrógeno (ERN)(Van Haaften y col., 2003).

El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia de un incremento de la exposición a oxidantes o del descenso de la protección contra éstos; ambos pueden ocurrir simultáneamente (Davies, 1999). Por ello, el estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de ERO y la protección antioxidante (Sies, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1989). El incremento de ERO lesiona a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. De este modo, enzimas y proteínas estructurales, membranas, ADN y RNA, son todos ellos susceptibles del daño oxidativo (Sies, 1985; Fridovich, 1995; Davies, 1999).

1.2.2. Clasificación de los radicales libres

Los radicales libres se han clasificado de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula (Hallinwell y Gutteridge, 1992). Los más frecuentes son los radicales libres de oxígeno, en cuya estructura está presente el oxígeno (O_2) como centro funcional. De menor preponderancia son los que contienen azufre, fósforo o nitrógeno como centro reactivo; dada la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los radicales libres de oxígeno son los más comunes. La mayoría de ellos provienen de reacciones metabólicas en las que éste participa, de ahí que el O_2 sea una molécula potencialmente tóxica. La reducción univalente del O_2 genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucran cuatro electrones, produciendo tres compuestos denominados: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Hallinwell y Gutteridge, 1992). El H_2O_2 no es un radical libre, pero cae en la categoría de ERO por ser un compuesto intermediario importante en la bioquímica de los radicales libres, ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición (principalmente Fe^{2+}) para producir el $\cdot OH$ (Hallinwell y Gutteridge, 1992). Además del O_2 , el nitrógeno también es capaz de formar radicales libres, como óxido nítrico ($NO\cdot$) y dióxido nítrico ($NO_2\cdot$), conformando las llamadas ERN (Dröge,

2002). A su vez, los radicales $\bullet\text{OH}$ son capaces de reaccionar con las biomoléculas, produciendo radicales libres orgánicos menos reactivos, como los peroxilos ($\text{ROO}\bullet$) y radicales tiol ($\text{RS}\bullet$). Por su parte el $\text{O}_2^{\bullet-}$, y $\text{NO}\bullet$ reaccionan entre sí para formar el peroxinitrito (ONOO) (Hallinwell y Gutteridge 1992; Chesseman y Slater, 1993).

1.2.3. Origen de las especies reactivas de oxígeno

Los sistemas biológicos poseen varios mecanismos productores de estas especies reactivas. Dentro de los sistemas endógenos uno de los mecanismos más importantes de producción de radicales libres es la cadena de transporte mitocondrial, concretamente en la denominada reducción monovalente o incompleta del O_2 que presenta un 3-5% del total en la que éste captura los electrones de forma secuencial, generando ERO (Nishikawa y col., 2000; Rolo y col., 2006). Además de este mecanismo, existen otros de origen endógeno, como son los mecanismos de acción bactericida de leucocitos y macrófagos, el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos, reacciones del citocromo P450 y NADPH oxidasa (Beckman y Ames, 1998).

1.2.4. Sistemas antioxidantes

Para equilibrar la respuesta oxidante los organismo aeróbicos disponen de una serie de sistemas defensivos antioxidantes que contrarrestan la formación de radicales libres. El término *antioxidante* se asigna aquella entidad química que, a bajas concentraciones, retarda o previene la oxidación de un sustrato, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA (Hallinwel y Gutteridge, 1992; Hallinwel, 1995). De éstos podemos destacar a las enzimas antioxidantes intracelulares, como la superóxido dismutasa (SOD) que convierte al radical superóxido en H_2O_2 , y la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) que transforman al H_2O_2 en dos moléculas de H_2O . También existen diversos componentes plasmáticos antioxidantes, como glutatión reducido, bilirrubina, ácido úrico y albúmina, además de las vitaminas A, C y E, así como los minerales selenio y zinc; las hormonas melatonina, deshidroepiandrosterona y estrógenos (Mecocci y col., 2000). Es de mencionar algunos sistemas secundarios o coadyuvantes, en este grupo encontramos: a la quinona óxido-reductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la glutatión-reductasa y los sistemas de reparación DNA/proteínas. En

condiciones fisiológicas, estos mecanismos de defensa mantienen una baja concentración de ERO en la célula y su actividad requiere ser forzosamente regulada; de aquí que el equilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes determine el grado de estrés oxidativo (Pierrefiche y Laborit, 1995; Finkel y Holbrook, 2000). De los sistemas antes mencionados, el que tiene mayor capacidad intracelular de secuestrar radicales libres es el sistema del glutatión, ya que puede atrapar al $O_2^{\cdot-}$, al $\cdot OH$, H_2O_2 y peróxidos orgánicos (Diplock, 1994).

1.2.5. Estrés oxidativo en las complicaciones de la diabetes

Numerosos estudios en el área clínica, morfológica y bioquímica han proporcionado suficientes evidencias para considerar a la hiperglucemia como el factor que determina el desarrollo de las complicaciones de la DM (Brownlee y col., 1981), aunque el exceso de ácidos grasos libres, el incremento en las concentraciones sistémicas de diversas citocinas, factores de crecimiento y angiotensina II contribuyen también en forma importante. Las complicaciones pueden ser agudas o crónicas, en el caso de las complicaciones crónicas, dependiendo de la alteración a los vasos capilares sanguíneos pequeños o de mayor calibre, se clasifican en micro o macrovasculares. Las primeras se relacionan principalmente con daño al endotelio y músculo liso de la microvasculatura y se manifiesta como neuropatía, retinopatía y neuropatía (Díaz Flores y col., 2004). Las macrovasculares incluyen la aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón en todas sus modalidades y son las principales causas de muerte de los pacientes diabéticos (American Diabetes Association, 1993).

El inicio de las complicaciones crónicas en el paciente diabético es producto de reacciones químicas y cambios en el metabolismo causados por el exceso de glucosa. Con este conocimiento, se han propuesto cinco mecanismos que las originan (Brownlee M., 2001; Thornalley y col., 2002): acumulación y acción de productos de glicación avanzada, incremento en la actividad de la vía del sorbitol, aumento en la vía de las hexosaminas, activación de diversas isoformas de la proteína cinasa C y aumento en el estrés oxidativo (Baynes y col., 1999, Maritim y col., 2003).

La vía del sorbitol está constituida por la acción secuencial de dos enzimas, la primera es la aldosa reductasa, que cataliza la conversión irreversible de la glucosa en sorbitol y la segunda, la sorbitol deshidrogenasa responsable de la conversión reversible de sorbitol en fructosa. La enzima limitante es la aldosa reductasa que, por tener baja afinidad por sus sustratos, sólo se activa de manera importante en presencia de un nivel intracelular alto de glucosa.

La aldosa reductasa está presente en la mayoría de los tejidos, como cristalino, retina, el endotelio vascular y los nervios. En estos tejidos el ingreso intracelular de la glucosa es independiente de insulina, facilitando con esto un aumento de la concentración intracelular de glucosa, misma que induce la activación de la vía del poliol o sorbitol. Como consecuencia de la activación de esta vía se acumula el sorbitol y la fructosa. El primero es el responsable de generar estrés osmótico en el cristalino, alterando la permeabilidad de la membrana y promoviendo cambios bioquímicos asociados con la formación de cataratas. La fructosa, al igual que la glucosa, aumenta el estrés oxidativo al formar productos de glicación avanzada (AGE). En esta vía se consume NADPH, que se requiere para otros sistemas antioxidantes y de esta manera, disminuye su disponibilidad para regenerar al GSH, aumentando el estrés oxidativo (Brownlee, 2001).

La glicación no enzimática consiste en la reacción de la glucosa u otros monosacáridos con las proteínas sin la participación de enzimas; dicha reacción depende de la concentración del monosacárido y del tiempo de contacto con las proteínas, determinado por la vida media de cada una en particular, alterándose su estructura, su antigenicidad, su catabolismo y, en general, su función (Thornalley y col., 2002; Díaz Flores y col., 2004); la hemoglobina glicada (AC1) es un ejemplo de ello y se utiliza como un método clínico en la evaluación de la glucemia diabética (Rahbar, 2005).

En la primera etapa de la glicación se produce la unión no enzimática y reversible del grupo aldehído de la glucosa con los grupos aminos de las proteínas (amino terminal, o ϵ -amino de lisinas) con la formación de aldíminas o bases de Schiff, después de ordenamientos moleculares se generan los productos de Amadori, llamados también

fructosaminas. En la segunda etapa, los compuestos de Amadori participan en una serie de reacciones irreversibles, llamadas reacciones de Millard, para dar los AGE. La formación de AGE comprende reacciones de deshidratación, condensación cíclica, entrecruzamientos intramoleculares y oxidación por las ERO. Los AGE están implicados en la génesis de las complicaciones microvasculares, así como en la formación de la placa ateromatosa (Stiff y col., 2002). Otra fuente de ERO es la autooxidación de la glucosa (Hunt y col., 1990) y en diferentes reacciones oxidativas que acompañan a la glicación de proteínas y ácidos nucleicos.

Finalmente, es de mencionar la producción de ERO vía transporte de electrones mitocondrial. Este mecanismo es considerado como la principal fuente de ERO (Nishikawa y col., 2000; Tianzheng y col., 2006; Rolo y Palmeira, 2006). Ésta inicia con la oxidación intracelular de la glucosa, por la vía glucolítica en el citoplasma, generando NADH y piruvato. El NADH citoplásmico puede donar equivalentes reducidos a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o bien reducir el piruvato a lactato, el cual se utiliza como sustrato para la gluconeogénesis hepática. El piruvato también es transportado a la mitocondria, donde es oxidado por la vía del ácido cítrico para producir CO_2 , H_2O , cuatro moléculas de NADH y una molécula de FADH_2 . En la mitocondria, NADH y FADH_2 proveen la energía para la formación de ATP mediante la fosforilación oxidativa por la cadena de transporte de electrones.

El flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se realiza por cuatro complejos enzimáticos asociados a la membrana interna, además del citocromo C y la ubiquinona (movilizador de electrones). El NADH que viene de las vías glucolítica y ciclo de Krebs dona electrones al complejo I. El FADH_2 , cuyos electrones provienen del ciclo de Krebs, dona sus electrones al complejo II. Los electrones de ambos complejos son acarreados a la coenzima Q, y después al complejo III, citocromo C, complejo IV y finalmente al oxígeno molecular con la formación de agua.

En condiciones fisiológicas la mayor parte de la energía del gradiente es utilizada para la síntesis de ATP, así el gradiente de protones mediante la ATPasa dirige la maquinaria sintética del ATP. Cuando la diferencia del potencial electroquímico

generada por el gradiente de protones es grande, conduce a una inhibición parcial del transporte de electrones en la coenzima Q, que se traduce en una reducción parcial del O_2 para formar $O_2^{\cdot-}$ (Nishikawa y col., 2000; Browlee, 2001, 2005). Esta reducción acelerada de la coenzima Q y la formación de ERO se considera la fuente principal de la disfunción mitocondrial y tiene una función crítica en los desordenes metabólicos y la histopatología tisular relacionada con la diabetes.

1.2.6. Alteración de la vía redox del glutatión en diabetes

El glutatión es un tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH), descubierto por Hopkins en 1921. Es el tiol no proteínico soluble en el citoplasma que se encuentra a concentraciones de 0.5 a 10 mmol/L (Meister, 1983) y juega un papel central en la defensa antioxidante. La molécula de glutatión puede encontrarse en dos estados de oxidación distintos: en forma reducida, como tiol (GSH) y en forma oxidada, compuesta por dos moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG) (De Leve y Kaplowitz, 1991). El cociente $[GSH]/[GSSG]$ frecuentemente es empleado como indicador celular del estado redox o de la capacidad antioxidante. En condiciones fisiológicas la relación $[GSH]/[GSSG]$ es >10 (Griffith, 1999).

Las células eucariotas poseen tres reservorios principales para el GSH. Casi el 90% del GSH celular está en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmático (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988; Hwang y col., 1992). Mientras que en este último compartimento la proporción GSH/GSSG es de 3:1, en el citoplasma y en la mitocondria este cociente sobrepasa la proporción 10:1 (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988).

En la molécula del glutatión, el enlace peptídico se establece entre el grupo γ -carboxilo del glutamato y el grupo α -amino de la cisteína. Este enlace atípico es el responsable de su estabilidad intracelular, ya que resiste la degradación por las peptidasas intracelulares, siendo hidrolizado específicamente por la enzima γ -glutamyltranspeptidasa (Meister, 1988; De Leve y Kaplowitz, 1991). GSH posee varias funciones vitales incluyendo la detoxificación de electrófilos, el mantenimiento de los

niveles esenciales de los tioles de las proteínas, la participación en los procesos de atrapamiento de los radicales libres, reservorio de cisteína y modulador de procesos celulares críticos, como son la síntesis de ADN, los procesos relacionados con los microtúbulos y la función inmune (Viña y col., 1986; Lu, 1999).

En su función antioxidante, GSH en presencia de una GPx selenio-dependiente, reduce los peróxidos producidos de manera endógena. Como resultado de esto, GSH se oxida a GSSG, que es nuevamente reducido a GSH por la GSSG reductasa, a expensas del NADPH, formando así un ciclo redox.

En la mitocondria, un orgánulo especialmente susceptible al daño oxidativo, el GSH es particularmente importante debido a que en este compartimento no hay catalasa. Varios estudios han demostrado que el GSH mitocondrial es crítico en la defensa contra el estrés oxidativo generado tanto fisiológicamente como de forma patológica (De Leve y Kaplowitz, 1991; Fernández-Checa y col., 1992 y 1997). Se ha observado una reducción selectiva del reservorio del GSH mitocondrial en ratas alcohólicas y deficientes en vitamina A y, de hecho, puede jugar un papel patogénico importante en el desarrollo de alteraciones hepáticas (Fernández-Checa y col., 1992; 1997; Barber y col., 2000).

El estrés oxidativo severo puede superar la capacidad de la célula de reducir el GSSG a GSH, lo que conduce a una acumulación de GSSG en el citosol. Para proteger a la célula de un trastorno en el equilibrio redox, el GSSG puede exportarse activamente fuera de la célula o reaccionar con un grupo sulfhidrilo proteínico, formándose un puente disulfuro entre estas dos moléculas. El estrés oxidativo intenso depleta el GSH de la célula (Meister, 1988; De Leve y Kaplowitz, 1991; Fernández-Checa y col., 1992).

Las evidencias clínicas y experimentales han demostrado que la concentración de GSH (Murakami y col., 1989), junto con la actividad de algunas enzimas que se requieren para su síntesis *de novo*, como la γ -glutamiltanspeptidasa y la γ -cisteinil glicina sintetasa, y para la vía redox, como la GPx y GR (Dincer y col., 2002), se

encuentran reducidas en diabetes. Este decremento en la actividad enzimática provoca alteraciones en la relación GSH/GSSG (Murakami y col., 1989), que probablemente puede contribuir a la génesis de las complicaciones del paciente diabético.

1.2.7. La medicina tradicional en las complicaciones de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus es uno de los padecimientos con mayor demanda hospitalaria a nivel nacional. Se conoce que varios de los factores de riesgo disparadores de la diabetes se han asociado con un incremento de ERO y disminución de los mecanismos de defensa antioxidante, lo cual contribuye al desarrollo de insulinoresistencia y complicaciones vasculares. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos adyuvantes con propiedades hipoglucemiante y antioxidante podrían ser esenciales para prevenir o frenar las alteraciones metabólicas inducidas por la hiperglucemia en la diabetes mellitus.

En los últimos años, se ha observado gran interés hacia la investigación de plantas medicinales; ya que numerosos estudios han demostrado que contienen principios activos susceptibles de ser aislados y modificados. En este contexto, un cierto número de plantas tradicionalmente utilizadas como antidiabéticas han mostrado actividad hipoglucemiante en animales de laboratorio o en el hombre y en algunos casos se ha logrado identificar y proponer los agentes responsables de la actividad. De la familia *Cucurbitaceae* varias especies se han utilizado para mitigar afecciones, dentro de las que se incluyen: *Cajanus indicus*, mejor conocida como Gandul en la India, que se usa como tratamiento para enfermedades del hígado, ictericia, hepatomegalia enfermedades cardiovasculares y diabetes. (Kirtikar y col., 1935; Ghosh y col., 1973). En el ratón albino (2 mg/Kg) bajo estrés oxidativo inducido con acetoaminofeno aumenta significativamente los niveles de GSH, así como las actividades de GPx, SOD y CAT, y disminuye los niveles de malondialdehído en hígado y riñón (Ayantika Ghosh y col., 2007 y 2008).

La planta *Cucurbita ficifolia* Bouché (*Cucurbitaceae*), conocida en México como chilacayote, se cultiva por sus frutos comestibles. Su propiedad hipoglucemiante se ha

puesto de manifiesto en conejos con hiperglucemia temporal (Román-Ramos y col., 1991), y conejos, ratas y ratones, sanos y con diabetes inducida con aloxana (Román-Ramos y col., 1992 y 1995; Alarcón Aguilar y col., 2002).

En estudios recientes se logró demostrar que *Cucurbita ficifolia* contiene *D*-quiro-inositol y flavonoides. Dosis de 300-600 mg/Kg de un extracto acuoso de la planta incrementaron el glucógeno hepático e insulina, y redujeron significativamente los niveles de glucosa y de hemoglobina glicada (Xia y Wang, 2006). En ratas sanas y con diabetes la administración de un extracto metanólico disminuyó los valores de glucosa sanguínea y el contenido de malondialdehído en tejido pancreático (Xia y Wang, 2006). Estudios de inmunohistoquímica indicaron que *Cucurbita ficifolia* Bouché previene la muerte de las células β -pancreáticas, además de restaurar aquellas que fueron destruidas parcialmente (Xia y Wang, 2006). Por otra parte, en estudios recientes realizados en nuestro laboratorio se ha logrado determinar que un extracto acuoso preparado a partir del fruto maduro de *Cucurbita ficifolia* aumenta los niveles de GSH y reduce los niveles de TBARS en hígado. Cabe destacar la posibilidad de propiedades antioxidantes de la planta por su contenido de polifenoles, especialmente flavonoides.

2. PLANTEAMIENTO

Tomando en cuenta que el desarrollo y progreso de la diabetes mellitus y sus complicaciones vasculares cursan con un estado oxidativo, alterando la relación GSH/GSSG marcadora del estado redox intracelular, es de esperar que la modificación repercuta en una variedad de vías metabólicas, active factores transcripcionales, afecte vías de proliferación y cascadas de señalización inflamatoria y apoptótica. Por lo tanto, el poder demostrar el efecto del extracto hipoglucemiante y antioxidante de *Cucurbita ficifolia* sobre las concentraciones de GSH, GSSG y las enzimas que participan en la vía redox del GSH, sería de gran ayuda, ya que esto podría retrasar o frenar las complicaciones vasculares en el paciente diabético.

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es una de las enfermedades de mayor incidencia a nivel nacional, caracterizada por un estado de hiperglucemia persistente asociado con estrés oxidativo. Las consecuencias de ello son las complicaciones vasculares características de la diabetes mellitus. En esta apreciación y con el conocimiento que el uso de plantas medicinales, con diferentes efectos biológicos, en México es muy amplio, una alternativa para disminuir las complicaciones vasculares de la DT2 es el uso de plantas hipoglucemiantes con actividad antioxidante, lo cual incrementaría la posibilidad de disminuir algunas de las complicaciones de la DT2, con la ventaja de ser menos costosas y más accesibles para la población.

4. HIPÓTESIS

Cucurbita ficifolia tiene efecto antioxidante, por lo tanto puede mejorar el cociente GSH/GSSG al reducir el incremento de especies reactivas de oxígeno y restaurar los requerimientos indispensables para que las actividades de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, trabajen con eficiencia y de esta manera regenerar al GSH.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar si un extracto de *Cucurbita ficifolia* con acción hipoglucemiante, tiene también actividad antioxidante a través de la vía redox del glutatión en diabetes experimental.

5.2. Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la administración del extracto sobre los niveles de glucosa en sangre, consumo de agua y alimento en ratones con diabetes experimental.

Determinar la relación de GSH/GSSG en hígado, riñón, corazón y páncreas en ratones con diabetes experimental tratados con el extracto.

Determinar la actividad de las enzimas GPX y GR en estos mismos órganos de animales con diabetes inducida tratados con el extracto.

Cuantificar la concentración de proteínas en los tejidos mencionados.

Evaluar el grado de lipoperoxidación (TBARS) en plasma de animales con diabetes inducida tratados con el extracto.

Comparar el efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* con la acción de la pioglitazona.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. MATERIALES

6.1.1. Productos y reactivos

Todos los productos químicos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA) en grado de pureza analítico. La dieta administrada a los animales de experimentación fue de Harlan^{MR}.

6.1.2. Aparatos e instrumental

- *Centrifugas.* Ultracentrífuga refrigerada Beckman Avanti TM 30 y centrífuga Hettich Zentrifugen Mikro 12-24.
- *Espectrofotómetro.* Perkin Elmer precisely Lambda 25 UV/VIS.
- *Homogeneizador.* Politron PT1200.
- *Balanzas.* OHAUS Analytical plus y Mettler AE 160.
- *Potenciómetro.* Beckman Expandomatic^R SS-2.
- *Lector de ELISA.* Labsystems Multiskan EX.
- *Glucómetro.* Accutrend Sensor ROCHE.
- *Otros.* Kit Glutathione Assay, Calbiochem.

6.1.3. *Animales de experimentación*

Los animales fueron cuidados y tratados de acuerdo con los criterios establecidos en la “Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio”, realizados por la National Academy of Sciences y publicados por el National Institute of Health.

Se emplearon ratones macho *Mus musculus*, de la cepa CD-1 con un peso aproximado de 30 ± 5 g, criados en el Bioterio UAM-Iztapalapa, en condiciones controladas, con agua y alimento *ad libitum*.

6.1.4. *Diabetes experimental*

El protocolo de trabajo estuvo conformado por cuatro grupos de ratones, a tres de ellos se les administró STZ a una dosis de 175 mg/Kg disuelta en amortiguador de citrato de sodio 0.1 M, pH 4.5 vía intraperitoneal. Ocho días más tarde se determinó la glucemia y los animales que presentaron concentraciones superiores a 200 mg/dL fueron incluidos en el estudio.

6.1.5 *Extracto de Cucurbita ficifolia*

El fruto maduro de *Cucurbita ficifolia* se obtuvo de Acolman, Estado de México, en Octubre de 2006, el endocarpio peso 18 kg, libre de semillas. El fruto de *Cucurbita ficifolia* tuvo un peso de 800 g una vez seco y molido. La extracción por maceración se realizó por disolventes de polaridad ascendente (n-hexano-CH₂Cl₂, metanol), y finalmente agua. El disolvente fue eliminado por destilación a presión reducida y el agua fue eliminada por liofilización. Posteriormente el liofilizado fue solubilizado en solución salina isotónica para su administración en los ratones.

6.1.6. *Tratamientos y obtención de tejidos*

Los grupos estuvieron conformados por 10 ratones, los cuales fueron asignados de la siguiente manera:

- Grupo 1: ratones control, los cuales recibieron solución salina isotónica
- Grupo 2: ratones con diabetes experimental.

- Grupo 3: ratones con diabetes experimental tratados con el extracto de *Cucurbita ficifolia* a una dosis de 200 mg/Kg (conteniendo 0.75 mg/g de *D*-quiro inositol)
- Grupo 4: ratones con diabetes experimental, tratados con pioglitazona a una dosis de 0.64 mg/Kg.

Los tratamientos se administraron diariamente durante 30 días vía intragástrica.

Al final de los tratamientos los animales fueron anestesiados (pentobarbital 25 mg/Kg) para obtener sangre total. Posteriormente, se perfundieron con solución salina 0.95 % para eliminar los restos de sangre. Finalmente se extrajeron fragmentos de hígado, riñón, corazón y páncreas y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Determinación de glucosa

Al inicio y al final de cada fase experimental se determinó la concentración de glucosa en sangre. Para ello se utilizó un medidor de glucosa, el cual determina la glucosa mediante fotometría de reflexión.

6.2.2. Determinación de GSH

Se prepararon homogeneizados de hígado, páncreas, riñón y corazón al 5% (p/v) en ácido metafosfórico al 5 %. Posteriormente, fueron centrifugados a 3000 g a 4°C por 10 min; en los sobrenadantes se realizó el ensayo de GSH siguiendo las indicaciones del equipo comercial (GSH Assay kit, Calbiochem). El fundamento del ensayo se basa en la formación de un producto de sustitución (tío éteres) entre el R1 y los mercaptanos presentes en la muestra, posteriormente se lleva a cabo una eliminación en presencia del reactivo R2 (NaOH al 30 %) el cual transforma específicamente el producto de sustitución con el GSH en un cromóforo que tiene una absorbencia máxima a 400 nm.

6.2.3. Determinación de GSSG

Se prepararon homogeneizados de hígado, páncreas, riñón y corazón al 10% (p/v) en amortiguador PBS 0.1 M, pH 7.5. Se tomaron alícuotas de los homogeneizados y se

trataron con 1-metil-2trifluorometanosulfonato vinilpiridinium 1 (M2VP) 10 mM y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

La determinación se realizó mediante un método enzimático (Títeze, 1969), el cual emplea M2VP para derivatizar al GSH sin interferir con la GR presente en el ensayo. GSSG es reducido a GSH, y a su vez cuantificado con el reactivo de Ellman (5-5'-ditiobis (2-nitro ácido benzoico), DTNB). La reducción es catalizada por la GR en presencia de NADPH. El ensayo utiliza el cambio en el desarrollo de color durante la reacción el cual es proporcional a las concentraciones de GSH y GSSG.

Los reactivos utilizados en la prueba son: amortiguador stock de Na_3PO_4 143 mM y EDTA 6 mM a pH 7.5; amortiguador preparado al día (NADPH 0.248 mg/ml disuelto en amortiguador stock), DTNB 6 mM; GR 173 U/mg proteína. Procedimiento: en una cubeta se agregaron los siguientes reactivos: amortiguador preparado al día (700 μl), DTNB (100 μl), muestra (200 μl ; ejemplo: 50 μl de muestra + 150 μl de agua). Mezclar y agregar la GR para iniciar el ensayo. La formación de 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) fue monitoreado a 412 nm.

6.2.4. *Actividades de la GPX y GR*

Se prepararon homogeneizados de hígado y páncreas al 10 % (p/v) en un amortiguador de PBS 0.1 M, pH 7.5 con un homogeneizador Polytron PT 1200. Posteriormente se centrifugó a 15 000 g a 4°C durante 30 min en una centrifuga BECKMAN Avanti™ 30. En los sobrenadantes se cuantificaron las actividades, para la GPX se analizó por el método de Rudack y colaboradores (1971); el cual determina la actividad mediante la producción de NADP^+ . En el caso de la GR por el consumo de NADPH (Beutler, 1969). Las actividades se expresan en mU/mg de proteína en las condiciones del ensayo. Una mU es igual a un nmol de NADP(H) producido por minuto. Los sistemas de reacción se especifican en las tablas 1 y 2.

Tabla 1**Sistema de reacción para determinar la actividad de GR**

Reactivos		Volumen (ml)	Concentración final (mM)
Tris	0.1M; pH8	2.6	87.7
EDTA	10 mg/ml	0.1	0.94
GSSG	50 mg/ml	0.1	4.6
NADPH	10 mg/ml	0.1	0.16

Mezclar, leer a 340 nm cada minuto hasta obtener 10 lecturas.

Tabla 2**Sistema de reacción para determinar la actividad de GPx**

Reactivos		Volumen (μ l)
Na ₃ PO ₄	0.05M, pH 8,	250
EDTA	4.3 mM	50
Terbutil-hidroperóxido	100 μ M	10
NADPH	0.25 mM	50
GPx	1 mg/ml	5
GR	0.5 u/l	5
GSH	1 mM	60

6.2.5. Método para cuantificar sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma

Se tomaron las muestras de sangre del seno orbital de ojo, mediante capilares con heparina. Se obtuvieron los plasmas y se trataron con butilato hidroxitolueno 2 mM disuelto en dimetil sulfóxido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. El grado de lipoperoxidación se evaluó como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante una técnica espectrofotométrica (Kikugawa y col., 1992). El fundamento del método se basa en la reacción producida entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el producto de lipoperoxidación, malondialdehído (MDA), lo que origina TBARS que puede medirse mediante espectrofotometría a 595 nm. El estándar de MDA se preparó con 1, 3, 3-tetrametoxipropano.

El sistema de reacción se ilustra en la tabla 3.

Tabla 3
Sistema de reacción para determinar TBARS

Reactivos	Volumen (ml)
H ₃ PO ₄ 0.2 M	0.2
TBA 0.11 M	0.025
Incubar a 90°C por 60 min	400
n-Butanol	
Centrifugar 6 000 rpm por 10 min	
Leer a 535 nm (sobrenadante)	

6.2.6. *Determinación de proteínas totales*

El método de Lowry (1954) es altamente sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteínas totales. La reacción que tiene lugar se desarrolla en las siguientes fases: 1) Reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu²⁺, en presencia de tartrato para evitar la precipitación, formándose un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico. 2) Reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (ácido fosfomolibdotúngstico), que se reduce por medio de los grupos fenol (en menor medida imidazol e indol) presentes en la proteína a un complejo de color azul oscuro, que se mide colorimétricamente. El complejo, presenta dos máximos de absorción a longitudes de onda de 560 y 680 nm. La solución estándar fue albúmina bovina 1mg/ml.

6.2.7. *Análisis Estadístico*

La evaluación estadística se realizó con la prueba de ANOVA. Los resultados que mostraron diferencias significativas, (p<0.05) se les aplicó la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer (NCSS).

7. RESULTADOS

7.1. Características generales de los animales tratados.

En la Tabla 4 se presentan los resultados del consumo de alimento y agua; así como las concentraciones de glucosa de los diferentes grupos de estudio.

El grupo con diabetes experimental mostró las glucemias más altas de los grupos evaluados, asociada con polidipsia y polifagia. Los tratamientos de *Cucurbita ficifolia* y pioglitazona disminuyeron la hiperglucemia en un 78 y 68%, respectivamente; mostrando *Cucurbita ficifolia* valores cercanos al control. Además de reducir significativamente el consumo de agua y alimento.

Tabla 4
Características generales de los animales con diferente tratamiento.

Grupos	Consumo de alimento (g/día)	Consumo de agua (ml/día)	Glucosa plasmática (mg/dl)
Control	5.18 ± 0.16	10 ± 0.1	56.2 ± 5.67
Diabetes experimental	11.86 ± 0.40 ^a	30.59 ± 1.36 ^a	386.66 ± 41.93 ^a
Diabetes <i>Cucurbita ficifolia</i>	9.66 ± 0.47 ^b	14.7 ± 0.7 ^b	84.66 ± 2.51 ^b
Diabetes Pioglitazona	12.03 ± 0.25 ^c	22.46 ± 0.75 ^d	121.75 ± 37.56 ^c

Los valores representan la media ± D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental.

c: $p < 0.05$ con respecto al grupo con diabetes experimental y el grupo *C. ficifolia*.

d: $p < 0.05$ con respecto al grupo con *C. ficifolia*.

7.2. Efecto de *Cucurbita ficifolia* y pioglitazona sobre la concentración de GSH, GSSG y relación GSH/GSSG

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran las concentraciones de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en hígado, páncreas, riñón y corazón de los diferentes grupos de estudio, respectivamente.

Fue evidente que el tejido hepático de los grupos diabetes experimental y tratados con pioglitazona mostraron decrementos de las concentraciones de GSH y aumentos de GSSG. Ambos cambios con diferencias significativas; lo cual alteró la relación GSH/GSSG. En el grupo tratado con *Cucurbita ficifolia* se aumentó GSH en un 60% y se redujo GSSG en un 29% aumentando en un 75% la relación GSH/GSSG con respecto al grupo diabetes experimental y el tratado con pioglitazona.

A pesar que el tejido pancreático del grupo diabetes experimental no presentó cambios en la concentración de GSH, si aumentó significativamente GSSG reduciéndose la relación GSH/GSSG con respecto al control. El tratamiento de *Cucurbita ficifolia* aumentó GSH en un 22 % y disminuyó GSSG en un 25 % mejorando la relación GSH/GSSG, en un 60 % con respecto al grupo diabetes experimental. En el caso de pioglitazona presentó cambios similares al grupo diabetes experimental.

En cuanto al riñón, tanto el grupo diabetes experimental como los tratamientos de *Cucurbita ficifolia* y pioglitazona tuvieron un comportamiento similar al tejido hepático. Con diferencias en cuanto a que después del tratamiento con *Cucurbita ficifolia* el aumento en la concentración de GSH fue de 2 y 1.5 veces más para el hígado y riñón, respectivamente y los decrementos de GSSG fueron de 1.5 y 1.0 veces menos para el hígado y riñón, respectivamente. Por lo que concierne a la relación fue de 4.16 y 1.4 veces más para hígado y riñón, respectivamente.

En el caso del corazón, el grupo diabetes experimental no presentó cambios en la concentración de GSH, sin embargo el incremento de GSSG modificó la relación GSH/GSSG.

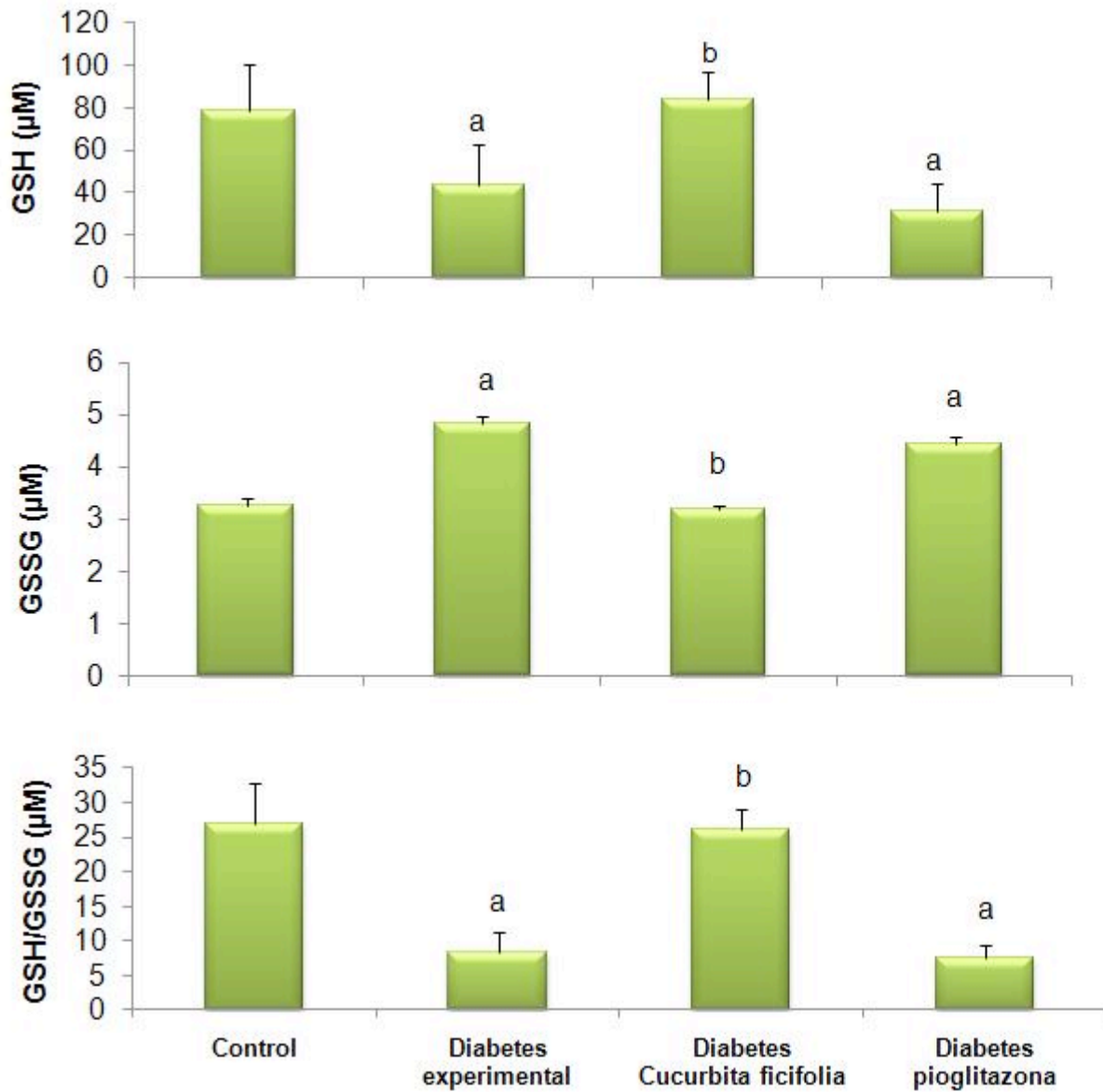


Figura 1. Concentraciones de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en hígado de ratones con diabetes experimental tratados con *Cucurbita ficifolia* o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental o pioglitazona.

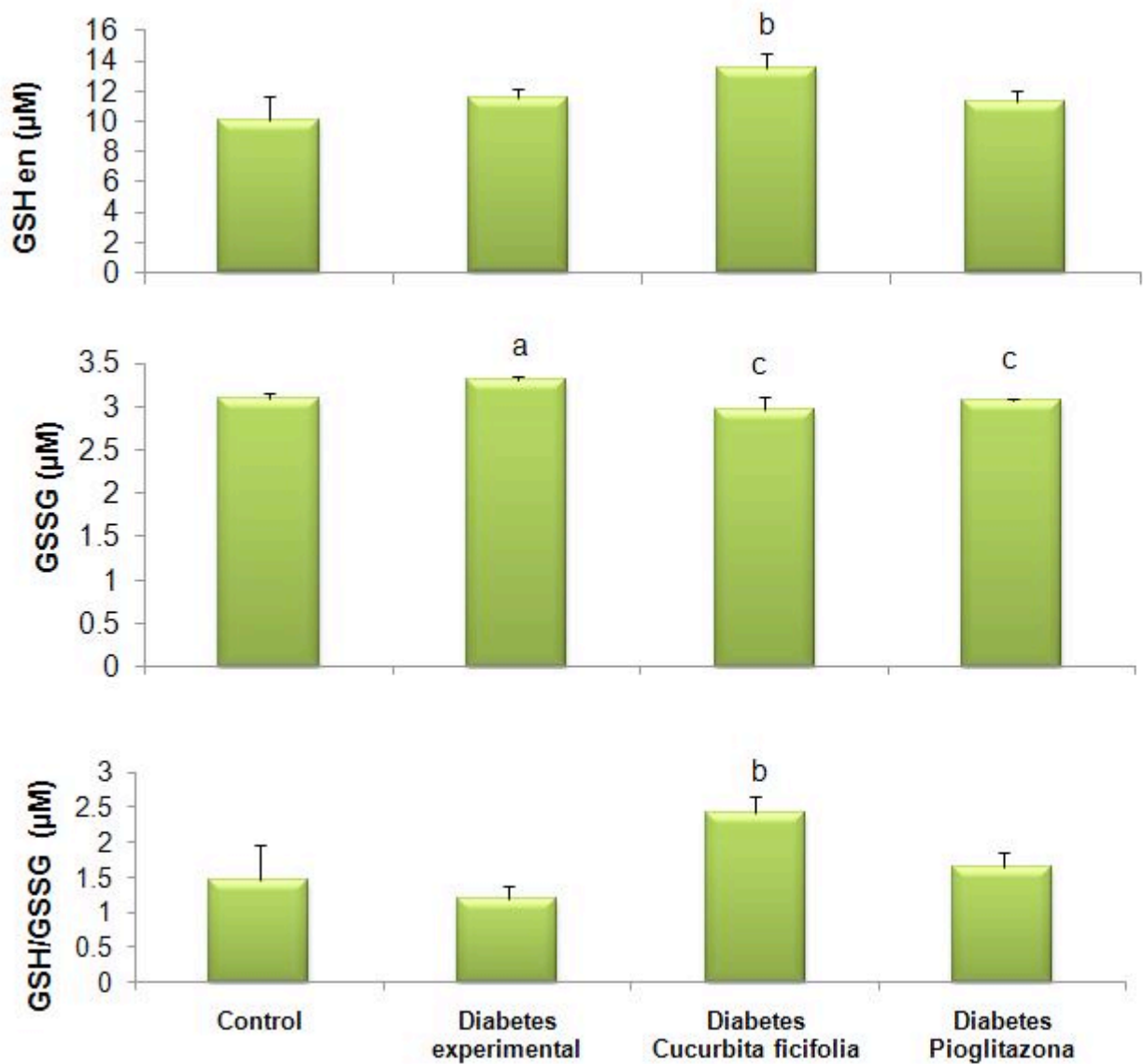


Figura 2. Concentraciones de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en páncreas de ratones con diabetes experimental con *Cucurbita ficifolia* o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental o pioglitazona.

c: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental.

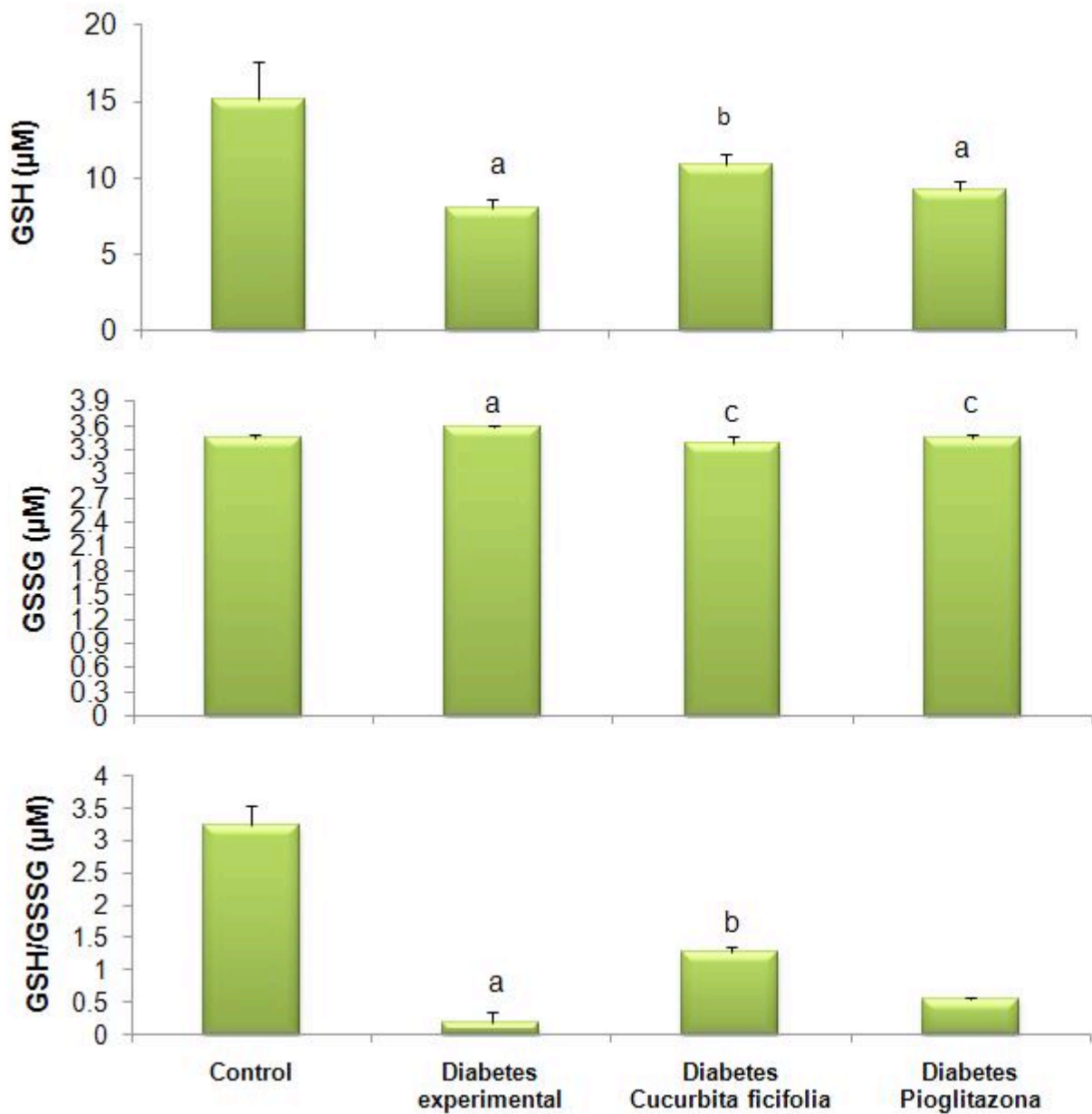


Figura 3. Concentraciones de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en riñón de ratones con diabetes experimental tratados con *Cucurbita ficifolia* o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.
a: $p < 0.05$ con respecto al control.
b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental o pioglitazona.
c: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental.

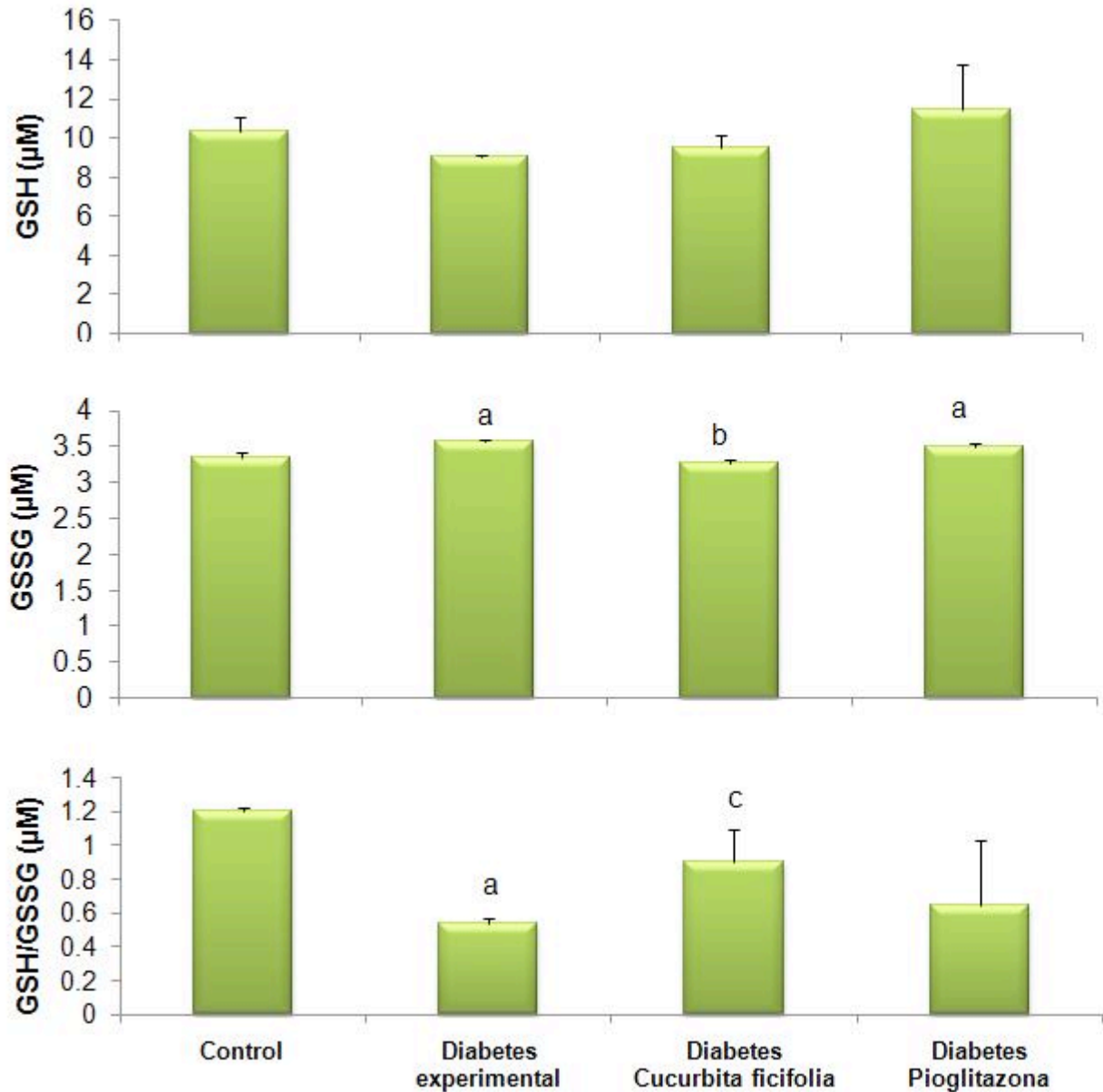


Figura 4. Concentraciones de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG en corazón de ratones con diabetes experimental tratados con *Cucurbita ficifolia* o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental o pioglitazona.

c: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental.

7.3. Cambios de las actividades de GPx y GR por *Cucurbita ficifolia* y pioglitazona en los ratones con diabetes experimental.

En las figuras 5, 6, 7 y 8 se muestran los cambios de las actividades de GPx y GR en hígado, páncreas, riñón y corazón, respectivamente.

Las actividades de GPx y GR en hígado, páncreas y riñón de los grupos diabetes experimental y pioglitazona mostraron incrementos aproximadamente de 1.5 veces más con respecto al control.

El tratamiento con *Cucurbita ficifolia* decrece las actividades, tanto de GPx, como de GR. El decremento correspondió aproximadamente a 1.44 y 1.7 veces menos respectivamente, cuando se comparó con el grupo control con diabetes experimental. Estos resultados indican que *Cucurbita ficifolia* restaura las actividades de GPx y GR en el ratón diabético.

En el caso del corazón no se encontraron diferencias con el tratamiento de *Cucurbita ficifolia*, sin embargo pioglitazona decreció significativamente GPx y GR, comparándolo con el grupo control con diabetes experimental.

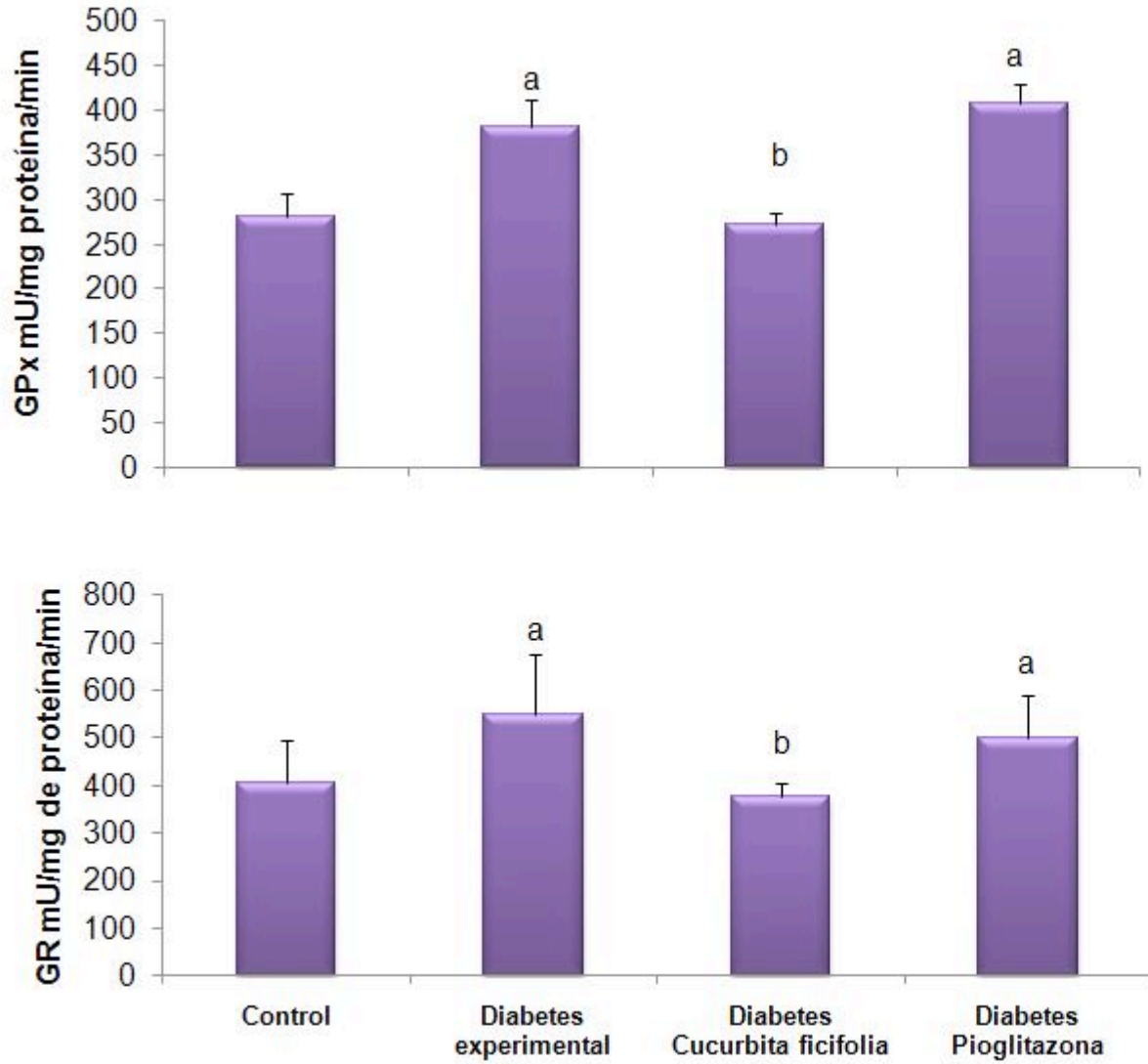


Figura 5. Actividades de GPx y GR en hígado de ratones con diabetes experimental tratados con *Cucurbita ficifolia* o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.
 a $P < 0.05$ con respecto al control.
 b $P < 0.05$ con respecto a diabetes experimental y pioglitazona.

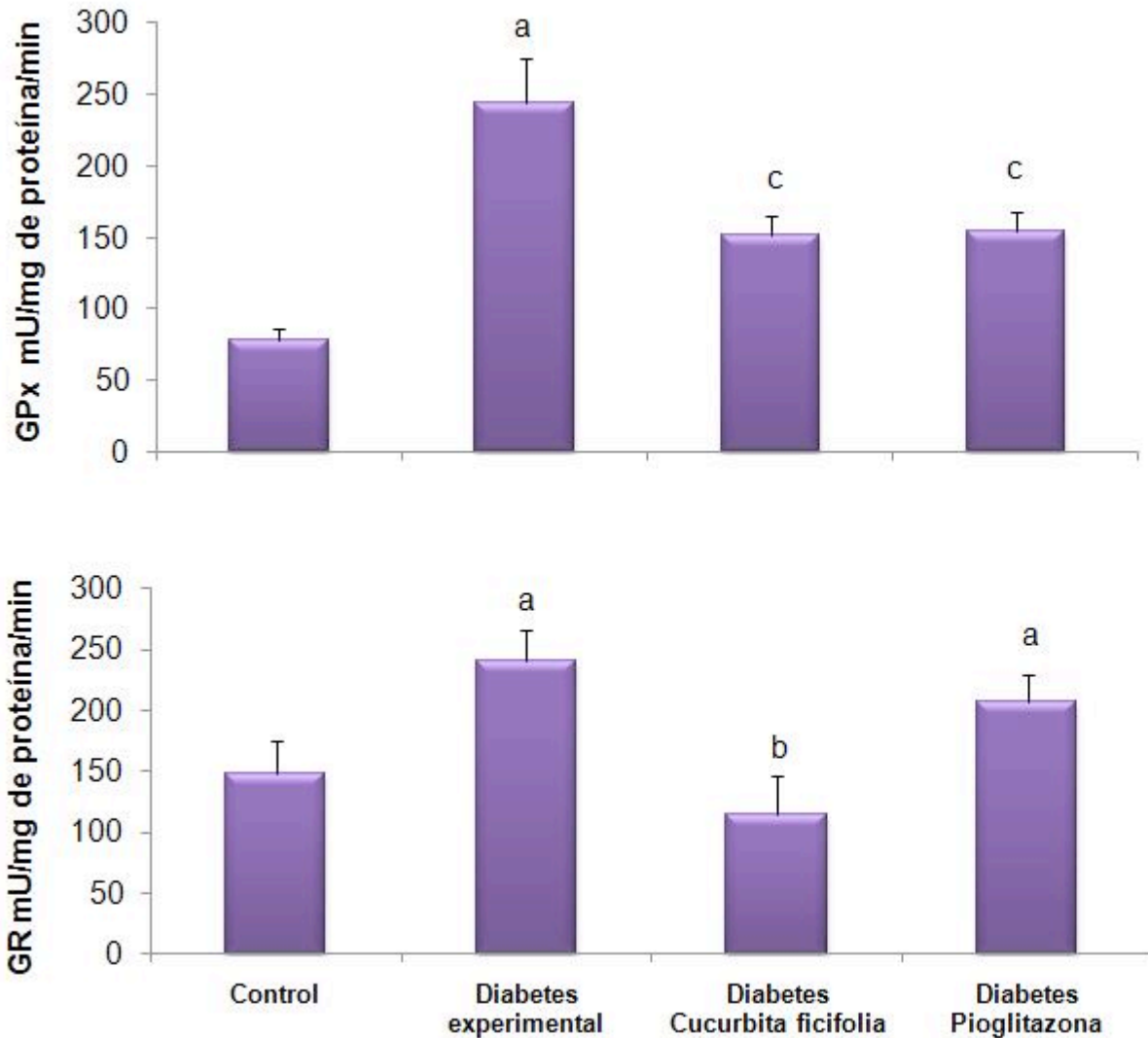


Figura 6. Actividades de GPx y GR en páncreas de ratones con diabetes experimental tratados con *Cucurbita ficifolia* o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental y pioglitazona.

c: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental.

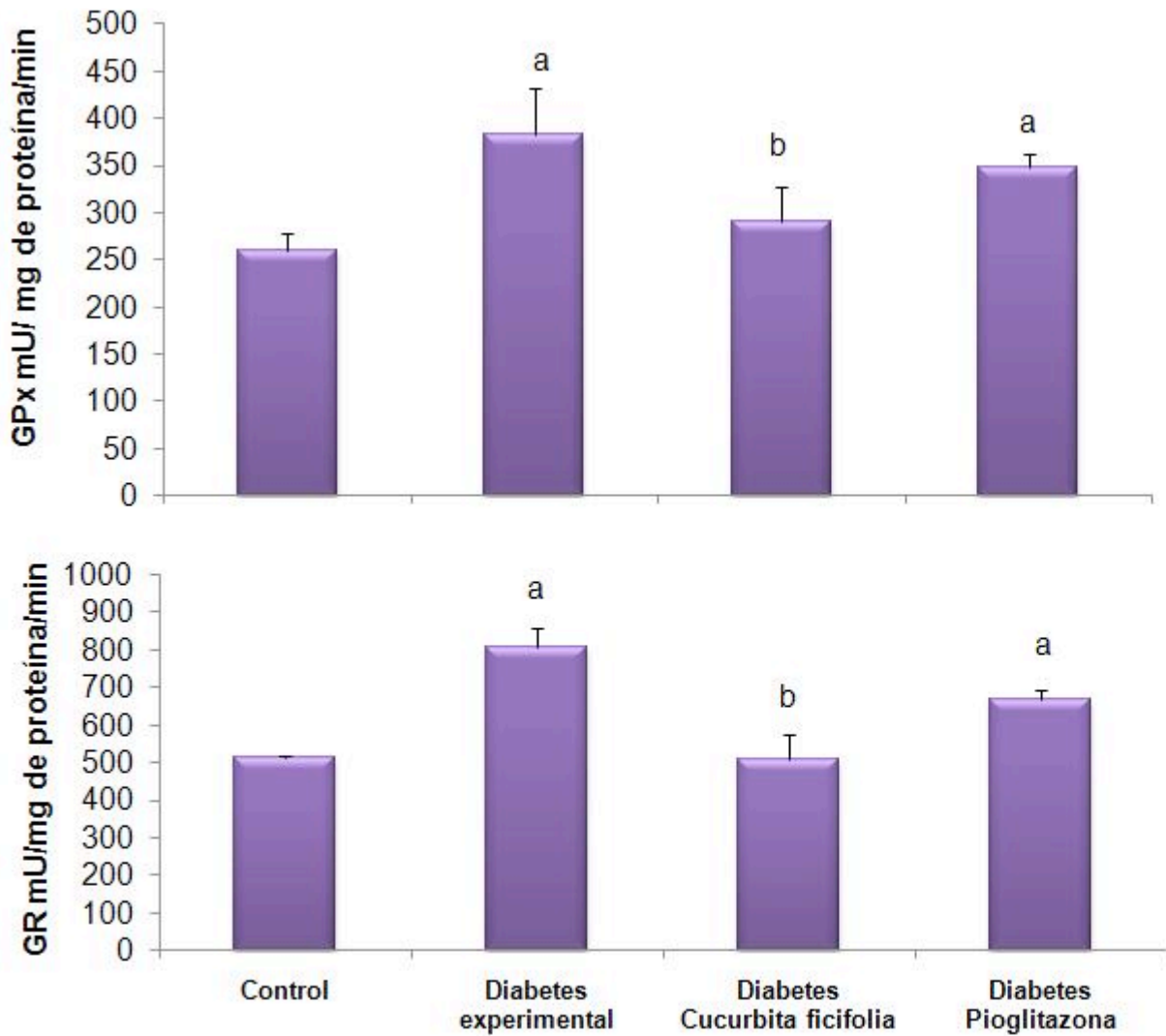


Figura 7. Actividades de GPx y GR en riñón de ratones con diabetes experimental tratados con *Cucurbita ficifolia* o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental y pioglitazona.

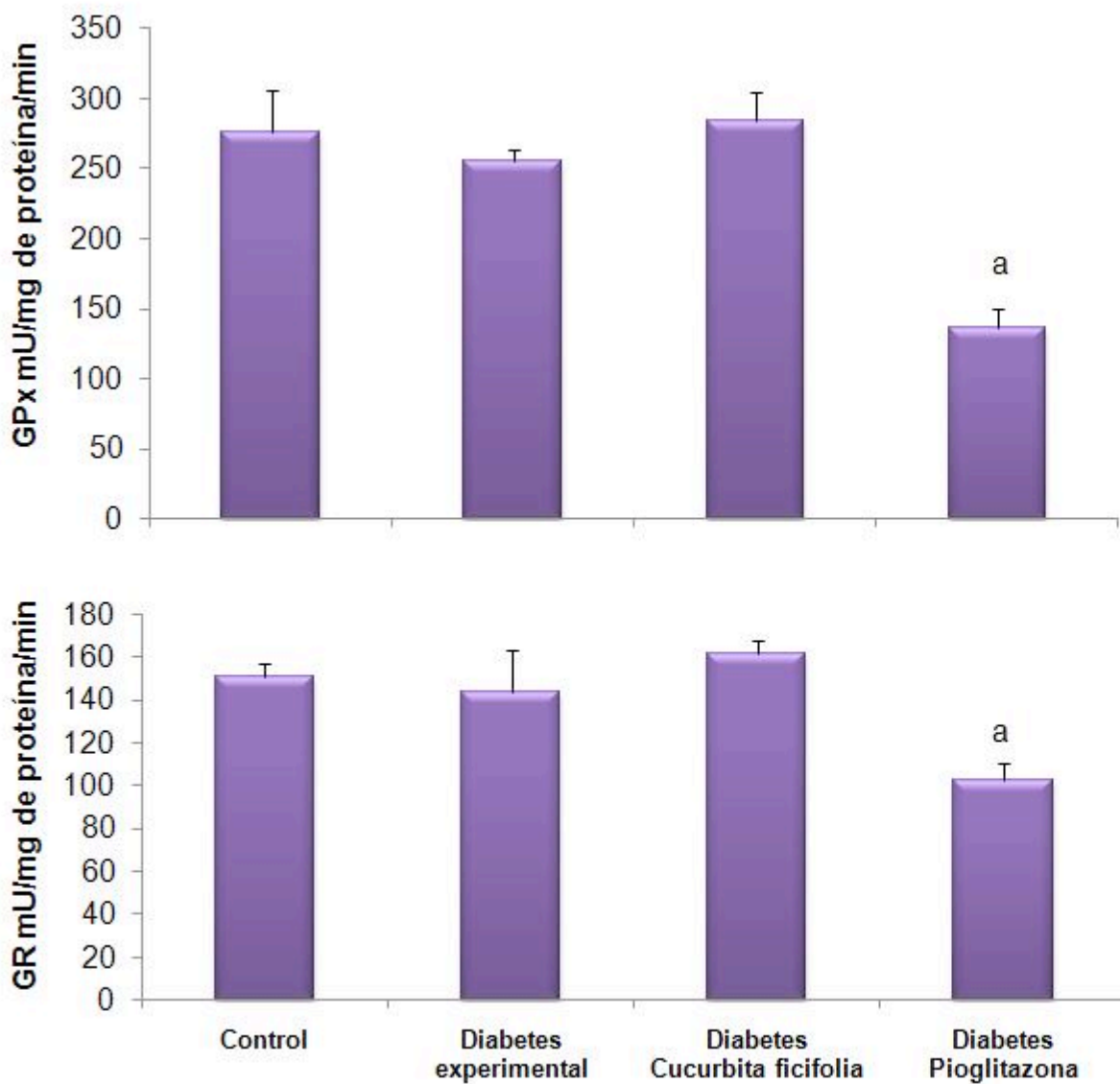


Figura 8. Actividades de GPx y GR en corazón de ratones con diabetes experimental tratados con Cucurbita ficifolia o pioglitazona. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

7.4. Efecto de *Cucurbita ficifolia* y pioglitazona sobre el grado de lipoperoxidación.

En la figura 9 se muestra el grado de lipoperoxidación de los diferentes grupos estudiados, evaluado por TBARS en plasma. Los resultados indican que la concentración de TBARS en el grupo diabetes experimental incrementó 5.19 veces más con respecto al control. En el caso de los grupos tratados con *Cucurbita ficifolia* y pioglitazona las concentraciones de TBARS decrecen en un 6.7 y 1.97 veces respectivamente cuando se comparó con el grupo control con diabetes experimental.

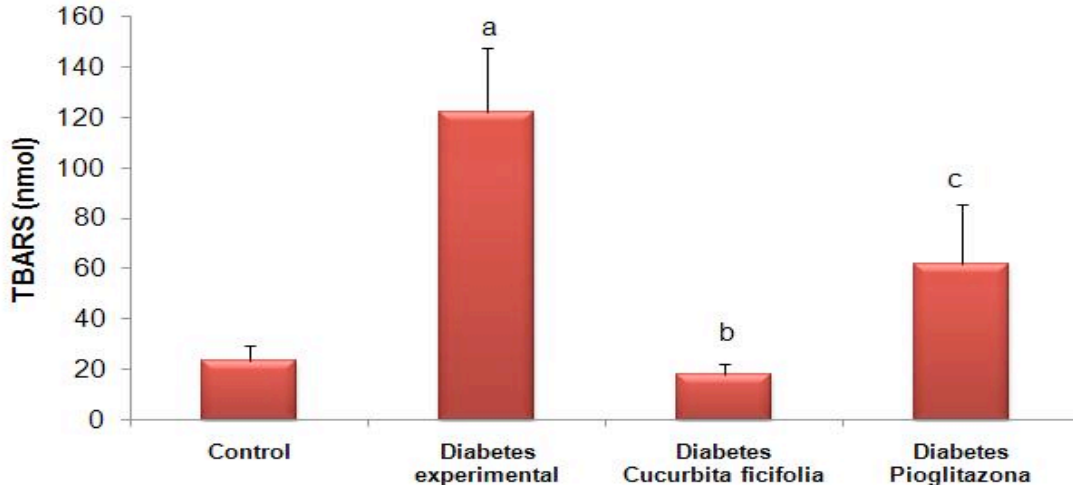


Figura 9. Concentración de TBARS en plasma de ratones con diabetes experimental con los diferentes tratamientos. Las barras representan la media \pm D.E de 10 animales por grupo.

a: $p < 0.05$ con respecto al control.

b: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental y pioglitazona.

c: $p < 0.05$ con respecto a diabetes experimental.

8. Discusión y conclusión

El presente estudio muestra evidencias de que la administración oral del extracto *Cucurbita ficifolia* disminuye significativamente la concentración de glucosa plasmática junto con el consumo de alimento y agua. Además en hígado, páncreas y riñón se incrementó la concentración de GSH, y disminuyó GSSG, aumentando la relación GSH/GSSG. En el caso de las enzimas GPx y GR *Cucurbita ficifolia* redujo significativamente su actividad; así como la concentración plasmática de TBARS. El tratamiento con pioglitazona también decreció significativamente la glucemia, la concentración de TBARS y solamente en corazón disminuyó la actividad de las enzimas GPx y GR junto con la concentración de TBARS.

El decremento del aumento de la glucemia por *Cucurbita ficifolia* pudo ocurrir a dos niveles: primero: debido a la liberación de hormonas gastrointestinales, específicamente del péptido 1 análogo de glucagón (GLP-1) responsable, en parte, del efecto incretina, término que describe la amplificación de la respuesta insulínica tras la ingesta de alimento (grasas, carbohidratos y proteínas) frente a la administración de una cantidad equivalente de glucosa por vía intravenosa (Drucker, 1990; Goke, 1991). A pesar del efecto agresivo de la STZ, los animales diabéticos cuentan con tejido pancreático remanente, que sintetiza y secreta insulina (Masiello, 1998), suficiente para inhibir al glucagón vía liberación de GLP-1. Por lo tanto, la liberación de insulina y una secreción reducida de glucagón limitarían la producción hepática de glucosa y estimularían la captación periférica de glucosa junto con el llenado gástrico, delimitando variaciones en los niveles de glucosa sanguínea posprandial (Darleen, 2009).

Junto a las acciones descritas de GLP-1, recientemente se demostró que estimula la proliferación de la célula β y su diferenciación a partir de las células de los *ductus* pancreáticos (Brubaker y Drucker, 2004). Se ha demostrado que la administración de *Cucurbita ficifolia* a ratones y a ratas diabéticas, incrementa el número de islotes pancreáticos y la secreción de insulina (Xia y Wang, 2007). Con estas evidencias se

refuerzan la posibilidad que la liberación de GLP-1 sea responsable de efecto hipoglucemiante que se observa después de la administración oral de *Cucurbita ficifolia*.

Segundo: es probable que *Cucurbita ficifolia* disminuya la glucemia a través de la inhibición de la actividad de enzimas como la α -glucosidasa, α -manosidasa y β -galactosidasa (Asano N y col., 1994), dado al contenido de azúcares del extracto. La inhibición de estas enzimas reduce la absorción de carbohidratos, decreciendo el incremento postprandial de glucosa en sangre (Rajeswari y col., 1991). Así, *Cucurbita ficifolia* pudiera tener un mecanismo parecido al de la acarbosa.

El tratamiento con pioglitazona también disminuyó la hiperglucemia, sin reducir el consumo de agua y alimento. En el presente estudio, el fármaco fue considerado como control positivo; ya que además de ser un hipoglucemiante bien caracterizado para el tratamiento de la diabetes cuenta con propiedades antioxidantes (Inoue y col., 2001). El efecto hipoglucemiante de pioglitazona es mediante la unión con PPAR γ (del inglés, peroxisome proliferator activated receptor gamma) al inducir la activación de genes que promueven la acción de la insulina, sin estimular su secreción (Ceriello y col., 1996). Esta acción favorece la exposición de un mayor número de transportadores de glucosa (GLUT4) y por lo tanto aumenta el ingreso de glucosa a la célula.

El incremento del consumo de agua y de alimento en los ratones con diabetes experimental es secuela de la hiperosmolaridad sanguínea generada por la hiperglucemia. La excreción de moléculas de glucosa con actividad osmótica favorece la pérdida de grandes cantidades de agua (poliuria). La consecuencia de la deshidratación, se activan los mecanismos reguladores de la ingestión de agua (polidipsia), por lo tanto hay una pérdida apreciable de Na⁺ y K⁺ por la orina. Por cada gramo de glucosa excretado se pierden 4.1 kcal; para cubrir este menoscabo aumenta la ingesta calórica oral (polifagia) incrementando la glucosa y con ello la glucosuria. Además la utilización deficiente de glucosa por las células de los núcleos ventromediales hipotalámicos también aumenta la ingesta en la diabetes. (Ganong WF, 1998).

En el grupo de *Cucurbita ficifolia* redujo de manera significativa el consumo de agua y alimento. Esto indica que al reducir la hiperglucemia desciende la hiperosmolaridad y los eventos que la acompañan. A pesar de que la pioglitazona decreció la hiperglucemia no modificó el consumo de agua y alimento, indicando que es posible que la dosis empleada no fue suficiente para reducir la hiperosmolaridad generada por la hiperglucemia.

Estudios previos han demostrado que las concentraciones de GSH y GSSG se modifican de manera inversa en la rata diabética, alterándose el cociente GSH/GSSG en hígado, páncreas y riñón (Zhi y col., 2001). Resultados similares encontramos en hígado y riñón del grupo diabetes experimental. Los cambios de GSH, GSSG y GSH/GSSG en los tejidos evaluados se atribuyen a la mayor utilización del GSH con la finalidad de contrarrestar el aumento en la producción de ERO, esto respaldado por el incremento de la concentración de TBARS en plasma.

Las evidencias recopiladas señalan que el tejido pancreático contiene baja actividad de enzimas antioxidantes (Grankvist y col., 1981). Estas observaciones refuerzan la noción de que las bajas concentraciones de enzimas antioxidantes en los islotes pancreáticos aumentan el riesgo de daño por ERO. Sin embargo, el hecho de que este tejido posea concentraciones bajas de antioxidantes se ha relacionado con la participación de las ERO en algunos eventos fisiológicos, como la secreción de la insulina inducida por glucosa. Por esta razón, se esperaba que GSH estuviera disminuido, aunque sí se observó una relación GSH/GSSG alterada. Otros trabajos han demostrado que el tratamiento con STZ abate los niveles de GSH en páncreas. Es posible que estas diferencias influya el modelo utilizado (rata o ratón), la edad de los animales, dosis de la STZ, o el método empleado en la determinación de GSH. La concentración de GSH, GSSG y GSH/GSSG en corazón del grupo diabetes experimental mostró un comportamiento similar al páncreas.

El tratamiento de *Cucurbita ficifolia* restauró las consecuencias del estrés oxidativo generado por la hiperglucemia, al incrementar significativamente los niveles de GSH decreciendo GSSG y mejorando la relación GSH/GSSG en hígado, páncreas y riñón. Esto indica que posiblemente *Cucurbita ficifolia* actúe mediante uno o varios compuestos que remuevan o induzcan la remoción de ERO, así validado por los niveles bajos de TBARS en plasma. En esta apreciación, *Cucurbita ficifolia* cuenta con propiedades antioxidantes debido a sus principios activos, específicamente el *D*-quiro inositol, un poli fenol ya caracterizado. Cabe la posibilidad que el *D*-quiro inositol y otros compuestos no caracterizados del extracto actúen atrapando las ERO y de esta forma reduzcan el estrés oxidativo. No se puede excluir la posibilidad de que este efecto proteja a las células pancreáticas al atrapar al NO•, el cual contribuye a la destrucción de los islotes y a la insulinitis. En cuanto al grupo tratado con pioglitazona, este agente mostró un comportamiento similar al grupo diabético, lo cual puede deberse a que ésta tiazolidinediona no contrarresta eficazmente la producción de ERO, así demostrado por el incremento de lipoperoxidación.

El creciente uso de los flavonoides se debe a su amplia actividad farmacológica. Entre las que destacan, su propiedad para unirse a los polímeros biológicos (enzimas, transportadores de hormonas, y al DNA), quelar iones metálicos de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres (Saskia, 1998) específicamente al anión superóxido, el radical hidroxilo, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de las ERO. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos su actividad antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors y col., 1990). Dada la variedad de propiedades del *D*-quiro inositol y/o de otros componentes de *Cucurbita ficifolia* también se agregaría que potencialmente puedan impedir la auto-oxidación de la glucosa; la cual requiere de la presencia de metales de transición, de esta forma el extracto frenaría las alteraciones metabólicas diabéticas debidas al estrés oxidativo.

El tejido que mostró las concentraciones más altas de GSH fue el tejido hepático, dado que aquí se lleva a cabo la síntesis de GSH, por ser el hepatocito el único que puede convertir a la metionina en cisteína a través de la vía de la transulfuración. La tasa de biosíntesis de GSH está condicionada por su tasa de exportación hacia el plasma y la bilis por distintos sistemas de transporte (Fernández Checa y col, 1992).

Los incrementos de los niveles de ERO, evaluados por TBARS durante la diabetes, pueden deberse al aumento de glucosa circulante en sangre, ya que ésta puede incrementar las ERO a través de su autooxidación y la glicosilación de proteínas (Hunt y col., 1990; Wolff y col., 1987).

Existe cierta controversia en los resultados de las enzimas antioxidantes en los tejidos. Algunos estudios informan actividades bajas en hígado, páncreas y riñón en diabetes experimental. En los mismos tejidos, este estudio encontró incrementadas las actividades de GPx y GR en los grupos control con diabetes experimental y el tratado con pioglitazona. Los aumentos podrían deberse a un mecanismo compensatorio en respuesta al incremento del estrés oxidativo. No obstante de presentar actividades altas de GPx y GR, en algunos casos las concentraciones de GSH están abatidas, esta falla puede deberse a falta de NADPH debido al decremento de la actividad de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (Staton y col., 2005; Díaz-Flores y col., 2006). Con el tratamiento de pioglitazona las dos enzimas mostraron el mismo patrón.

El grupo que recibió *Cucurbita ficifolia* restableció las actividades de GPx y GR en hígado, páncreas y riñón, a niveles similares al control normal. Es posible que al reducir las ERO por el extracto de *Cucurbita ficifolia* las enzimas de la vía redox del GSH bajen su actividad; ya que tanto GPx y GR son enzimas altamente sensibles al daño oxidativo. También se puede hipotetizar que ocurra recuperación de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, abasteciendo el NADPH requerido por la enzima GR y de esta manera aumentar las concentraciones de GSH junto con la relación GSH/GSSG.

En conclusión, nuestros resultados confirman que la administración oral del extracto de *Cucurbita ficifolia* cuenta con propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes. Como hipoglucemiante, a reserva de ser confirmado en un futuro, al estimular la liberación del péptido GLP1 o como inhibidor de glucosidasas. En cuanto a la propiedad antioxidante se explica por la presencia del *D*-quiro inositol, hidroxifenol que puede metabolizar ERO. Ambas propiedades repercuten para que la vía redox del GSH trabaje con eficiencia.

9. Bibliografía

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

American Diabetes Association. (1993). Consensus statement: role of cardiovascular risk factor in prevention and treatment of macro-vascular disease in diabetes. Diabetes Care 1:72-78.

Asano N, Oseki K, Kizu H, Matsui K. (1994). Nitrogen in the ring pyranoses and furanoses: structural basis of inhibition of mammalian glycosidases. J Med Chem 37: 3701-3706.

Ayantika GP, Parames C. (2007). Anti-oxidative effect of a protein from *Cajanus indicus* L against acetaminophen-induced hepato-nephro toxicity. Biochem Mol Biol 40:1039-1049.

Ayantika G, Parames C. (2008). A Protein from *Cajanus indicus* Spreng protects liver and kidney against mercuric chloride-induced oxidative stress. Biol Pharm Bull 31:1651-1658.

Barber JM, Crean JT. (2000). Guardianship in the elderly and the Community Care Act: more of the same?. Health Bull 58(6):471-477.

Baynes JW. (1999). Role oxidative stress in diabetic complications; a new perspective on an old paradigm. Diabetes 48:1-9.

Beckman, Ames BN. (1998). Mitochondrial aging: open questions. Ann NY Acad Sci, 20:118-127.

Bors W, Heller W, Christa M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol 186:343-355.

Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414:813-820.

Brownlee M. (2005). The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. Diabetes 54:1615-1625.

Brubaker PL, Drucker DJ. (2004). Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. Endocrinology 145:2653-2659.

Ceriello A. (2003). New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care* 26:1589-1596.

Chesseman KH, Slater TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49:481-493.

Clifford J, Flatt. (1988). Animals syndromes of non insulin dependent diabetes mellitus. In: Pickup C, Wiññiams G, eds. *Textbook of diabetes mellitus*. 2nd ed. Blackwell Science 23:1-23.

Committee Report. (1997). Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-1198.

Davies MJ y Dean RT. (1999). *Radical-mediated protein oxidation*. Oxford University Press, Oxford.

Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. (1995). Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlations with nitric oxide-releasing or O⁶-alkylating ability. *Biochem Pharmacol* 50:2015-2020.

De Leve LD, Kaplowitz. (1991). Redistribution of cardiac output during localized granulomatous inflammation and the effect of methysergide in anesthetized rats. *Inflammation* 4:359-369.

Díaz Flores M. (2006). Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la vía redox del glutati3n en diabetes experimental. Tesis, 18-21.

Díaz Flores M, Baiza Gutman LA, Ibáñez Hernández HA, Pascoe Lira D, Guzmán Greenfel A y Kumate Rodríguez J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia cr3nica. *Gac Méd Méx* 140:437-447.

Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H. (2002). Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 51:1360-1362.

Diplock AT. (1994). Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med* 15:293-376.

Dr3ge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:48-95.

Drucker, DJ. (1990). Glucagon and the glucagon–like peptides. *Pancreas* 5:484-488.

Durán-Reyes G, Pascoe-Lira D, Vilar-Rojas C, Medina-Navarro R, Díaz-Flores M, Ortega-Camarillo C, García Macedo R, Cruz M, Rodríguez JK. (2004). Diabetogenic effect of STZ diminishes with the loss of nitric oxide: role of ultraviolet light and carboxy-PTIO. *Pharmacology* 71:17-24.

Elsner M, Gudbakke B, Tiedge M, Munda TR, Lenzen S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43:1528-1533.

Finkel T, Holbrook NJ. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 9:239-247.

Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112.

Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Marí M, Ardite E, Morales A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 273:7-17.

Ganong WF. (1998). Funciones endocrinas del páncreas y regulación del metabolismo de los carbohidratos. *Fisiología Médica. Manual Moderno*, editores. 381-382.

Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. (1981). CuZn-superoxide dismutase; Mnsuperoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199:393-398.

Ghosh A, Biswas K. (1973). "Bhartiya Banausadhi" editores by Chatterjee A., Calcutta University Press, Calcutta 332-334.

Goke R, Fehman H, Goke B. (1991). Glucagon-like peptide-1 amideis a new incretin/enterogastrone . *J Clin Invest* 135:135-144.

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

Halliwell By Gutteridge JM. (1992). Biologically relevant meta-ion dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 307:108-112.

Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. (1994). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 94:1543-1549.

Hugués-Hernandorena B, Rodríguez-García JC, Rodríguez-González L, Marrero-Rodríguez MT. (2002).

Hunt J, Smith C, Wolf SP. (1990). Autoxidative glycosylation and possible involvement of preoxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39:1420-1424.

Inoue I, Goto SI, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S. (2001). The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma increase Cu²⁺, Zn²⁺ superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 50(1): 3-11.

Kakkar R, Jawahar K, Subrahmanyam V, Prasad M K. (1995). Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol and Cell Biochem* 151:113-119.

Kirtikar KR, Basu BD.(1935).“Indian Medicinal Plants Vol. I,” editores By Blatter E., Caius JF, Mhaskarr RS, Probasi Press, Calcutta 1, 809.

Laboratorio de farmacología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (2006).

Levovitz HE. (1999). Type 2 diabetes: An overview. *Clin Chem* 45:1339-1345.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Lu SC. (2000). Regulation of glutathione síntesis. *Curr Top. Cell Regul.* 36: 95-116.
Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers DG. (1982). Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:927-930.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review *J Biochem Mol Toxicol* 17:24-38.

Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47:224-229.

Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G. (2000). Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 28: 1243-1248.

Meister A, Anderson ME. (1988). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.

Meredith MJ, Reed DJ. (1982). Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* 257(7):3747-3753.

Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Shimada M, Kawakami Y. (1989). Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 38:753-758.

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790.

Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-29918.

Pierrefiche G, Laborit H. (1995). Oxygen free radicals, melatonin and aging. *Exp. Gerontol* 30:213-227.

Rajeswari P, Natarajan R, Nadler JL, Kumar D, Kalra VK. (1991). Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. *J Cell Physiol* 149:100-109.

Rahbar S. (2005). The discovery of glycated haemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci* 1043:9-19.

Rivera-Dommarco J, Barquera S, Campirano F, Campos-Nonato I, Safdie M, Tovar V. (2002). The epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutr* 14:113-122.

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

Román-RR, Flores SJL, Partida-HG, Lara-LA, Alarcón-AF. (1991). Experimental study of the hypoglycaemic effects of some antidiabetic plants. *Arch Invest Med* 22: 87-93.

Román-RR, Lara LA, Alarcón-AFJ, and Flores-SJL. (1992). Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch Med Res* 23:105-109.

Román-RR, Flores-SJL, Alarcón-AFJ. (1995). Antihyperglycemic effect of some edible plants. *J Ethnopharmacol* 48:25-32.

Saltiel AR, Kahn CR. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.

Sandlers S, Swenne I. (1983). Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 25:444-447.

Saskia ABE, Van Accker, Bast AALT. (1998). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. En Flavonoids in health and disease. Editores Marcel Dekker, INC 9:221-251.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes 43:1326-1333.

Sies H, Stahl W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nutr Dec 62:1315S-1321S.

Staton CA, Lewis CE. (2005). Angiogenesis inhibitors found within the hemostasis pathway. J Cell Mol Med 9:286-302.

Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR, Anderson NL. (2002). The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in the experimental diabetes. Diabetes 51:2826-2832.

Tianzheng Y, James L, Robotham, Yisang Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. Proc Natl Acad Sci (En prensa).

Tietze F. (1969). Enzimatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total an oxidized glutathione . Analytical Biochem 27:502-522.

Thornalley PJ, Jahan I, Ng R. (2002). Suppression of the accumulation of triosephosphates and increased formation of methylglyoxal in human red blood cells during hyperglycaemia by thiamine in vitro. J Biochem 129:543-549.

Viña JR, Davis DW, Hawkins RA. (1986). The influence of nitrous oxide on methionine, S-adenosylmethionine, and other amino acids. Anesthesiology 64(4): 490-495.

Van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A. (2003). Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. Drug Metab 35:215-253.

Welsh N, Sandler. (1994). Protective action by hemin against interleukin-1 beta induced inhibition of rat pancreatic islet function. Mol Cell Endocrinol 103:109-114.

West E, Simon OR, Morrison EY. (1996). Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. West Indian Med J 45:60-62.

Wolff SP, Dean RT. (1987). Glucose autoxidation and protein modification the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 245:243-250.

Xia T, Wang Q. (2006). D-chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 58.

Zhi Xu, Kaushik P, Patel, Marjorie F, Lou, George J, Rozanski. (2002). Up-regulation of K channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovascular Res* 53:80–88.

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 la vía redox de GSH en diabetes experimental”.

Jurado de Examen



Presidente
Dr. Rubén Román Ramos
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Secretario
Dr. Miguel Cruz López
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS



Vocal
Dra. Clara Ortega Camarillo
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS



Vocal
Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Laboratorio en Biología del Desarrollo,
Unidad de Morfología FES-Iztacala, UNAM.