



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Efecto de *Cucurbita ficifolia* Bouché sobre marcadores inflamatorios y PPARs en
macrófagos y adipocitos en co-cultivo.”

TESIS

Que para obtener el grado de maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. ROSARIO WENDOLINE ROSILES ALANIS

Directores:

Dr. Julio César Almanza Pérez

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Asesora:

Dra. Angeles Fortis Barrera

México D.F. Noviembre 2016

COMITÉ TUTORAL

Co-Directores:

- Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Profesor-Investigador Titular C

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

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

jcap@xanum.uam.mx

- Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

Investigador Titular B

Laboratorio de Fitoquímica.

Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) – IMSS.

azamilpa_2000@yahoo.com.mx

Asesora:

- Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera

Profesor-Investigador Titular A

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

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

fortis11_10@yahoo.com.mx

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y en el Laboratorio de Fitoquímica en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur, del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Xochitepec, Morelos.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020. Para la realización de los estudios de maestría la alumna Rosario Wendoline Rosiles Alanis, contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro de la beca 570657 /CVU: 636179.

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis titulada "Efecto de *Cucurbita ficifolia* Bouché sobre marcadores inflamatorios y PPARs en macrófagos y adipocitos en co-cultivo.", que presentó la Biol. Exp. Rosario Wendoline Rosiles Alanis, el día 23 de noviembre de 2016.

Presidente

Dr. Rubén Román Ramos.
Profesor-Investigador Titular C
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
rrr@xanum.uam.mx




Secretario

Dra. Ángeles Fortis Barrera.
Profesor-Investigador Titular A
Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Nacional Autónoma de México
fortis11_10@unam.mx



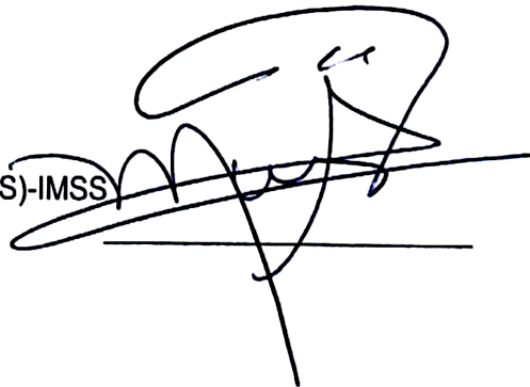
Vocal 1

Dra. Rebeca García Macedo
Investigadora Asociada C
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades, CMN SXXI. IMSS
gamareb@yahoo.es



Vocal 2

Dr. Manasés González Cortázar
Investigador Titular B
Laboratorio de Fitoquímica
Centro de investigación médica del Sur (CIBIS)-IMSS
gmanases@hotmail.com



DEDICATORIA

A mi papá que siempre ha creído en mí, que me ha fomentado el amor al conocimiento y el aprendizaje y la importancia de la curiosidad. Gracias por todo el amor que me has dado y por siempre darme lo mejor.

A mi mamá que siempre me ha brindado comprensión y amor, me has enseñado a valorar lo que (gracias a ustedes) tengo. Por tus cuidados toda la vida, no me pudieron tocar mejores padres que ustedes.

A Yuri porque desde siempre me has impulsado a ser la mejor versión de mí que pueda, a descubrir y perseguir mis intereses aun cuando me dan miedo, a buscar mis habilidades y aprovecharlas. Por ver cosas buenas en mí que yo a veces no veo, por creer en mí y estar ahí para enseñarme a ver las cosas de una manera más optimista y por ser mi corrector de estilo durante todo este trabajo. Gracias por ser mi compañero y cómplice todo este tiempo, además de mi corrector de estilo...Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Julio Almanza** por guiarme en este largo camino de aprendizaje, por abrirme las puertas de su laboratorio y sobre todo por brindarme su amistad.

Al **Dr. Zamilpa** por su paciencia, amabilidad y disponibilidad, por sus valiosas enseñanzas que enriquecieron este trabajo y por recibirme en su laboratorio.

A la **Dra. Ángeles Fortis** por su apoyo y asesoría en este trabajo.

A los **Doctores Ruben Román Ramos, Rebeca García Macedo, Manasés González Cortázar**, por haberse tomado el tiempo de revisar mi tesis y darme tan atinadas sugerencias.

A **mis compañeros de laboratorio** Dr. Gerardo, Abraham, Jhovan, Betty, Jessica, Ivan, Eli, Kika, Diana, por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar y un segundo hogar.

A **mis amigos**, Betty (por tu gran ayuda y compañía durante todo este proyecto), Bea, Memo, Jhovan, Gibrán, Soraya, Arturo, Joel, por las ocasionales risas, los momentos de des-estrés y su apoyo, hicieron de estos años algo bonito. A María, Diana, Lorena, por estar ahí para mí cuando lo necesito, por sus tonterías que me hacen reír, por su bonita amistad.

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	VI
II. ÍNDICE DE TABLAS	IX
III. LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
IV. RESUMEN.....	1
V. ABSTRACT.....	4
VI. INTRODUCCIÓN.....	6
Obesidad y sobrepeso.....	6
Diabetes Mellitus	8
Relación Obesidad-DT2	10
PPARs.....	11
Inflamación y sus implicaciones.....	13
Adipocinas y sus características.....	16
Tratamiento farmacológico de la obesidad y DT2.....	18
Antecedentes	19
Utilización de plantas con propiedades o acciones biológicas	19
VII. JUSTIFICACIÓN.....	22
VIII. HIPÓTESIS.....	23
IX. OBJETIVO GENERAL	24

X. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
XI. VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	25
Obtención del extracto acuoso de <i>Cucurbita ficifolia</i>	25
Análisis fitoquímico del extracto acuoso de <i>Cucurbita ficifolia</i>	25
Bipartición con acetato de etilo	25
Extractos de <i>Cucurbita ficifolia</i>	26
Extracciones sucesivas con disolventes de polaridad ascendente	27
Cuantificación de Salicina en Extractos obtenidos de <i>Cucurbita ficifolia</i>	28
Cultivo de las líneas celulares RAW264 y 3T3-L1.	29
Co-cultivo de líneas celulares RAW264.7 y 3T3-L1	30
Pruebas de viabilidad celular por medio de ensayo con MTT	31
Cuantificación de los niveles de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 en el medio de cultivo. .	32
Análisis de expresión de RNAm de FATP1, GLUT-4, PPAR γ , PPAR α , TLR-4, Adiponectina, TNF- α , IL-6, IL-10.....	32
Prueba de tolerancia a la glucosa	33
XII. RESULTADOS.....	35
Rendimientos de Extractos y Fracciones	35
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	35
Cromatografía en Capa Fina	40

Cuantificación de Salicina en Extractos obtenidos de <i>Cucurbita ficifolia</i>	41
Pruebas de funcionalidad celular con MTT.....	43
Ensayo Agudo In vivo de tolerancia a la glucosa.	44
Cinética de producción de TNF- α	45
Cinética de expresión de PPAR γ y GLUT-4.....	46
Expresión relativa de PPAR γ y GLUT-4 en adipocitos 3T3-L1	48
Co-cultivo por intercambio de medios condicionados	49
Expresión de PPAR α , PPAR γ , GLUT-4, FATP-1 en adipocitos 3T3-L1 con medio condicionado de macrófagos	49
Expresión de TNF- α , IL-6, Adiponectina, en adipocitos 3T3-L1 con medio condicionado de macrófagos	52
Liberación de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β en macrófagos tratados con medio condicionado.....	54
Expresión de TNF- α e IL-6, IL-10, TLR-4 en Macrófagos con medio condicionado	55
Liberación de citocinas en macrófagos por ELISA	57
Sistema de Co-cultivo simultáneo.....	60
Liberación de Citocinas en adipocitos y macrófagos sometidos a co-cultivo simultáneo	60

Expresión de PPAR γ en co-cultivo simultáneo de adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7	61
XIII. DISCUSIÓN.....	62
XIV. CONCLUSIONES	73
XV. PERSPECTIVAS	74
XVI. REFERENCIAS	75
XVII. ANEXOS.....	i

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes y cebadores utilizados para el análisis de expresión en células 3T3-L1 y RAW 264.7.....	33
Tabla 2. Pesos obtenidos de extractos y fracciones.....	35
Tabla 3. Curva de Calibración de Salicina.....	41
Tabla 4. Concentración de Salicina presente en Extractos acuosos de <i>Cucurbita ficifolia</i>	42
Tabla 5. Citocinas liberadas por cambio de medios de cultivo.	70
Tabla 6 . Expresión de PPAR γ , GLUT-4, PPAR α , FATP-1, Adiponectina en Adipocitos con cambio de medios de cultivo.	70
Tabla 7. Expresión de citocinas y TLR-4 en macrófagos por cambio de medios de cultivo.....	70

III. LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
FID	Federación Internacional de Diabetes
DT2	Diabetes Tipo 2
RI	Resistencia a la Insulina
TZDs	Tiazolidinedionas
PPARγ	Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma
PPARα	Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa
FATP-1	Proteína transportadora de ácidos grasos 1
ACSL-1	Isoforma 1 de acetil CoA sintetasa
GLUT-4	Transportador de glucosa 4
AGLs	Ácidos grasos libres
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
IL-6	Interleucina 6
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
IRS-2	Sustrato del receptor de insulina 2
<i>C. ficifolia</i>	<i>Cucurbita ficifolia</i>
D-QI	D-Quiroinositol
CLAR	Cromatografía de Alta Resolución
RT-PCR	Reacción en reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa
Cdna	DNA complementario

TAP Tejido adiposo Pardo

TAB Tejido adiposo Blanco

IV. RESUMEN

La obesidad es una de las enfermedades crónico-degenerativas más comunes a nivel mundial y nacional. Es el principal factor de riesgo para desarrollar padecimientos como la Diabetes Tipo 2 (DT2), hipertensión, complicaciones cardiovasculares e incluso algunos tipos de cáncer. Su etiología es multifactorial, entre los factores que caracterizan su desarrollo se encuentran el estilo de vida sedentario y una mala alimentación, así como factores genéticos y ambientales. Se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo, principalmente en la zona central del cuerpo. Así mismo, la obesidad desarrolla estados de inflamación crónica de bajo grado, en donde la participación de los macrófagos es crucial para el mantenimiento de dicho estadio de inflamación. La inflamación crónica de bajo grado se caracteriza por la secreción continua de mediadores inflamatorios, principalmente citocinas, así como la infiltración de macrófagos al tejido adiposo, lo que convierte a dicho tejido como una fuente importante de generación de citocinas inflamatorias. El estado de inflamación crónico de bajo grado se ha asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina, así como de complicaciones vasculares. En la actualidad existe un gran número de fármacos utilizados para tratar la obesidad y patologías asociadas a ella. Sin embargo, dicha terapéutica tiene como objetivos principales; disminuir la absorción de ácidos grasos (Orlistat), favorecer la oxidación de los ácidos grasos y disminuir la dislipidemia (fibratos) o disminuir los niveles de glucosa (antidiabéticos). Dejando de lado el tratar de restablecer la condición inflamatoria que caracteriza a la enfermedad. En México, la población hace uso de la medicina tradicional como medio alternativo para su

tratamiento. Dentro de las especies ampliamente estudiadas, con propiedades antidiabéticas y antiinflamatorias se encuentra *Cucurbita ficifolia*. El objetivo de éste trabajo fue evaluar el efecto de un extracto estandarizado de *Cucurbita ficifolia*, sobre la expresión de RNAs mensajeros de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), transportadores involucrados en el metabolismo de glucosa y ácidos grasos (GLUT-4, FATP-1), citocinas y liberación de las mismas, en adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7 sometidos a un co-cultivo.

En este estudio logramos observar que el extracto de *Cucurbita ficifolia*, produce un incremento en la expresión de GLUT-4 y un descenso en FATP-1, en adipocitos sometidos a co-cultivo por intercambio de medio de cultivo, y la liberación de TNF- α e IL-6 incrementa, mientras que la liberación de IL-1 β disminuye. Por el contrario, cuando los macrófagos son sometidos a co-cultivo por intercambio de medio de adipocitos tratados con *Cucurbita ficifolia*, TNF- α , IL-6 e IL-10 disminuyen su liberación a la vez que disminuye la expresión de TLR-4. De manera similar, cuando el co-cultivo de las líneas celulares fue simultáneo, la liberación general de TNF- α , IL-6 e IL-10 disminuyó y se dio un incremento en la expresión de PPAR γ por parte de los adipocitos. El extracto fue estandarizado con base en su contenido de salicina y fue utilizado a una concentración de 10 μ g/ml.

Los resultados derivados de ésta investigación permiten concluir que la relación tan estrecha que existe entre el adipocito y el macrófago, influye sobre el patrón de expresión y liberación de citocinas. *Cucurbita ficifolia* genera efectos directos en ambos

tipos celulares, ya que modifica el patrón de secreción de citocinas como TNF- α e IL-6, las cuales son producidas por los dos tipos celulares.

Es necesario continuar con la investigación de *Cucurbita ficifolia*, en particular de moléculas identificadas con potencial farmacológico como la salicina, la cual puede ser la responsable de su actividad antiinflamatoria, debido a su naturaleza química.

V. ABSTRACT

Obesity is becoming one of the most common chronic-degenerative diseases worldwide. It is the number one risk factor to develop pathologies such as Type 2 Diabetes, high blood pressure, cardiovascular diseases and even some types of cancer. It is a multifactorial condition commonly caused by a combination of excessive food intake, lack of physical activity, and genetic susceptibility (Yazdi, Clee et al. 2015). It is defined as the accumulation of excess body fat to the extent that it results in other health complications, reducing life expectancy (Bahreini, Noor et al., 2013).

Nowadays, there are several pharmacological treatments for obesity related pathologies, however, such therapeutics are aimed towards fatty acids absorption, oxidation, and controlling their blood levels and decreasing glycaemia, leaving aside the restoration of the inflammatory condition that characterizes the disease. In Mexico, the population uses traditional plants as an alternative treatment. *Cucurbita ficifolia* is an example of the species widely used and studied, it has shown anti-diabetical and anti-inflammatory properties. The aim of this study was to evaluate the effect of a standardized *Cucurbita ficifolia* extract, over expression of peroxisome proliferators activated receptors (PPARs), metabolic associated genes (GLUT-4, FATP-1), cytokines expression and secretion (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β) in 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages, under co-cultured conditions. Extract was standardized under its salicin content and was applied at a 10 μ g per ml to the cells.

C. ficifolia extract produced an increased GLUT-4 expression, and decreased FATP-1 in adipocytes with treated macrophages conditioned media exchange, as well as an

increased TNF- α and IL-6, and decreased IL-1 β secretion. Contrary to this, when macrophages were treated with adipocyte conditioned media (treated with *C. ficifolia*), TNF- α , IL-6 and IL-10 secretion declines, while TLR-4 expression is lowered.

When both cell lines were co-cultured simultaneously, the overall release of TNF- α , IL-6 and IL-10 decreased, while adipocyte expression of PPAR γ increased.

These results allow us to conclude that a close relationship between adipocytes and macrophages, influence the gene expression pattern and cytokine release.

C. ficifolia generates direct effects in both cell types, as it modifies secretion patterns such as those given for TNF- α and IL-6, which are produced by the two cell types. It is still necessary to continue the research on *C. ficifolia*, to identify molecules with pharmacological potential, such as salicin, which may be responsible for its biological activity.

VI. INTRODUCCIÓN

Obesidad y sobrepeso

La obesidad es provocada por distintos factores, entre los que destaca el desbalance energético, en donde se gasta menor cantidad de energía, de la que es ingresada al organismo por el consumo de alimentos. Existen otros factores como un contexto o ambiente obesogénico y la predisposición genética. El componente genético puede influenciar a distintos niveles tanto en cómo se distribuye el metabolismo energético, la predisposición a acumular tejido adiposo en sitios específicos, la contribución de mecanismos regulatorios y de comportamiento que controlan el consumo de alimentos, derivando en un estado de desbalance energético (Choe, Huh et al., 2016).

En México, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad es del 71.28% (48.6 millones de personas), lo que significa que 7 de cada 10 mexicanos tienen sobrepeso u obesidad. La prevalencia de sobrepeso es de 38.8% y la de obesidad es de 32.4%. El sobrepeso se da cada vez en etapas más tempranas del desarrollo, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños en edad escolar de 5 a 11 años, es del 34.4%, de lo cual el 19.8% corresponde a prevalencia de sobrepeso y el 14.6 a obesidad (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012).

A nivel mundial la obesidad ha tenido un incremento de más del doble, en el 2014, más de 1900 millones de adultos de 10 años en adelante, presentaban sobrepeso, de los cuales más de 600 millones eran obesos, en porcentajes esto corresponde a que el 39% de las personas adultas de 18 años en adelante presentaban sobrepeso y el 13%

obesidad. En el caso de niños menores de 5 años, 41 millones presentaban sobrepeso u obesidad (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Con el aumento en el consumo de energía y la baja tasa de gasto energético que caracteriza a la obesidad, la energía remanente se almacena en ciertos tejidos, el principal y mayor acumulador de energía en forma de grasa es el tejido adiposo.

El tejido adiposo está constituido por distintos tipos celulares como fibroblastos, pre-adipocitos, adipocitos maduros, macrófagos, linfocitos y células endoteliales. Hasta la fecha se conocen dos tipos distintos de tejido adiposo; el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo pardo (TAP), cuya estructura y funciones varían en el modo de acumulación de los triacilglicéridos, morfología, número de mitocondrias y vascularización. En cuanto a su función, el TAB se encarga de fungir como reservorio energético y el TAP se encarga de generar calor y mantener el equilibrio térmico del organismo, entre otras funciones (Mancuso, 2016).

Además de fungir como reserva energética, secreta un gran número de sustancias bio-activas que intervienen en procesos fisiológicos y la homeostasis de estos; como la ingesta de alimentos y la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa, la remodelación vascular para la regulación de la presión arterial y la coagulación, entre otros (Sanchez-Muñoz, 2005). Entre las sustancias que secreta el tejido adiposo, se encuentran las citocinas o también llamadas adipocinas, involucradas en el metabolismo de la glucosa y lípidos, así como la respuesta inmune del organismo. Las citocinas se encargan de comunicar a distintos órganos incluyendo cerebro, hígado, músculo y sistema inmune.

La obesidad se caracteriza por la hipertrofia de los adipocitos, seguida de un incremento en la angiogénesis, infiltración de células inmunes y sobreproducción de matriz extracelular, a esto se le conoce como remodelación del tejido adiposo (Itoh, Suganami et al., 2011).

Existe una íntima relación entre la respuesta del sistema inmune y el metabolismo energético (carbohidratos y lípidos), están evolutivamente ligados y mantienen algunos aspectos en común, por lo tanto, es posible imaginar que existen vías regulatorias que se traslapan y que regulan funciones tanto metabólicas como inmunes a través de sistemas de señalización y moléculas regulatorias claves. Esto podría permitir la gestión de nutrientes, a través de sistemas sensores de patógenos como los receptores similares a Toll (TLRs), dando lugar a respuestas inflamatorias inducidas por el estado nutricional y metabólico. Es necesario mencionar que el tejido adiposo posee una arquitectura en donde los adipocitos y las células del sistema inmune están cercanas y que esta configuración le brinda un ambiente propicio para interacciones dinámicas entre respuestas inmunes y metabólicas, estableciendo así comunicación con otros sitios como lo son las islas pancreáticas y el músculo. Esta interface contribuye posiblemente a la importancia de la conexión de estos órganos en la iniciación de enfermedades metabólicas, principalmente en el contexto de la obesidad y la DT2 (Hotamisligil y Erbay, 2008).

Diabetes Mellitus

La diabetes Mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa, caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre, consecuencia de la deficiente secreción de insulina por

el páncreas y/o disminución de la acción de la insulina. Es un problema tanto en México como a nivel mundial, se estima que para el 2030 habrá cerca de 366 millones de diabéticos en el mundo, de los cuales el 70% residirán en países en vías de desarrollo. Es un padecimiento que se caracteriza por propiciar el desarrollo de complicaciones vasculares como la retinopatía, nefropatía y neuropatía y problemas macrovasculares como infartos y enfermedades cerebrovasculares, por lo que es considerada como un trastorno complejo que conlleva a una disminución de la esperanza y calidad de vida en quienes la padecen. Es la cuarta causa de muerte por enfermedad y supera el millón de casos anuales en países en vías de desarrollo (Rodríguez, 2010).

México se encuentra entre los primeros 10 países con mayor número de diabéticos. El primer censo de pacientes diabéticos, realizado en 2004 por el IMSS, estimó un total de 2,334,340 personas afectadas por esta enfermedad. Es una enfermedad de alto costo para los sistemas de salud, pues quienes la padecen acuden con mayor frecuencia a las unidades de atención médica, reciben más medicación, tienen mayor probabilidad de ingresar a servicios de urgencias y requieren hospitalizaciones más prolongas por las complicaciones, en comparación de quienes no la padecen (Rodríguez Bolaños RA 2010); (Olokoba, Obateru et al., 2012).

La Diabetes Mellitus puede ser clasificada en 4 categorías principales:

- Diabetes Mellitus Tipo 1 (DT1), causada por la destrucción de las células β -pancreáticas que por lo general conlleva a una nula secreción de insulina.
- Diabetes Mellitus Tipo 2 (DT2), por una secreción insuficiente, defectuosa o por resistencia a la insulina.

- Otros tipos de diabetes causadas por defectos genéticos, defectos en la función de las células β -pancreáticas, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades relacionadas con la función exócrina del páncreas (como fibrosis quística), o provocada por medicamentos o químicos.
- Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), diagnosticada durante el embarazo (American Diabetes, 2014).

El sobrepeso y la obesidad son factores importantes implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (DT2). En la actualidad se han identificado mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina, principalmente en el receptor de insulina, así como en el sustrato de receptor de insulina (IRS-1 y 2), en donde se ha determinado un incremento en la fosforilación en los residuos de serina, provocando la inhibición de las vías de señalización dadas por insulina. Los ácidos grasos, el lipopolisacárido (LPS) y algunas citocinas también son agentes desencadenantes de la fosforilación del receptor de insulina e IRS en sitios de serina (Velloso, Folli et al., 2015).

Relación Obesidad-DT2

La obesidad, la resistencia a la insulina y la DT2 están asociadas con inflamación crónica, que se caracteriza por una secreción anormal de citocinas, aumento en la producción de reactantes de fase aguda y otros mediadores inflamatorios, así como la activación de distintas vías de señalización inflamatoria (Gregor y Hotamisligil, 2011).

La respuesta inflamatoria que emerge en presencia de la obesidad parece estar disparada por el tejido adiposo y reside en el mismo, aunque existen otros órganos involucrados en el transcurso de las patologías, como el hígado. Adicional a sus propiedades inherentes en manejo de energía y homeostasis metabólica, el tejido adiposo es un sitio clave de interacción entre adipocitos y otros efectores del sistema inmune. La mayoría de estudios han examinado al tejido adiposo en la búsqueda de mecanismos subyacentes de la obesidad, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y aterosclerosis, que presentan defectos tanto en las vías metabólicas, como inflamatorias, se ha observado que tanto macrófagos como adipocitos poseen características similares en cuanto a la producción de citocinas proinflamatorias y a vías de señalización (Sanchez-Muñoz, 2005).

PPARs

Los procesos de inmunidad innata, inflamación y metabolismo están coordinadamente regulados por lípidos. Muchos factores de transcripción, particularmente aquellos en la familia de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y receptor X en hígado, parecen jugar un papel crucial modulando estas vías y los lugares en donde tienen intersección. La activación de estos factores de transcripción, inhibe la expresión de muchos genes involucrados en la respuesta inflamatoria en macrófagos y adipocitos (Agarwal, Yadav et al., 2016).

Los ligandos de la familia de PPARs suprimen la producción de citocinas proinflamatorias mediante la inhibición de la actividad de NF- κ B. La activación de

PPARs suprime la producción de mediadores inflamatorios de manera recíproca con la regulación del metabolismo lipídico (Glass y Ogawa, 2006).

El tejido adiposo expresa los receptores nucleares PPAR (receptores activados por proliferadores de perixosomas), principalmente la isoforma PPAR γ . Estos fungen como factores de transcripción de algunos genes codificantes para proteínas involucradas en el metabolismo, como son los transportadores de glucosa GLUT, Acetil CoA sintetasa y Proteína transportadora de Ácidos Grasos 1 (FATP-1), entre otros. Estos factores de transcripción regulan procesos biológicos como la adipogénesis, en donde los pre-adipocitos se expanden, almacenando triacilglicéridos cuando la energía generada por el consumo de alimentos es mayor que la energía gastada, por lo que su actividad está relacionada con el balance energético (Takada, Kouzmenko et al., 2009).

Algunos ácidos grasos libres de cadena larga, como el ácido palmítico, pueden ser reconocidos como ligandos de los PPARs. Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que también fungen como factores de transcripción de diversos genes, han sido considerados como blancos terapéuticos, ya que su activación tiene una influencia en el metabolismo principalmente de carbohidratos y lípidos, además de regular la expresión de algunas citocinas inflamatorias. Los activadores de estos receptores han mostrado una inhibición en la expresión de genes que codifican para algunas citocinas, como IL-2, IL-6, IL-8, TNF α , implicados en la respuesta inflamatoria (Wang Z, 2008).

El planteamiento de que un sensor de ácidos grasos como PPAR γ , puede ser regulador en el metabolismo de la glucosa, surge precisamente del descubrimiento de que las Tiazolidinedionas (TZD). Las TZD son agonistas de PPAR γ , actúan incrementando la acción de la insulina a nivel de la captura de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo, inhibiendo la producción y liberación de glucosa hepática, así como a nivel molecular, mejorando la capacidad de los adipocitos de almacenar lípidos, disminuyendo la liberación de ácidos grasos libres y la acumulación de triacilgliceroles en músculo y otros tejidos, disminuyendo la lipotoxicidad, lo cual conlleva a una mejora de la respuesta a la insulina (Carvajal, 2007).

Inflamación y sus implicaciones

El exceso de tejido adiposo, principalmente visceral, se favorece el desarrollo de una inflamación crónica de bajo grado, que coadyuva con la generación de resistencia a la Insulina y DMT2. Existe una teoría que habla de la reacción inflamatoria en la obesidad como un mecanismo de protección propio del organismo, para evitar una acumulación excesiva de grasa que imposibilite el movimiento, sin embargo, no se ha comprobado la participación plena de la reacción inflamatoria en este proceso fisiológico. La acumulación de lípidos y tejido adiposo es un proceso anabólico estimulado por insulina, mientras la liberación de citocinas inicia procesos catabólicos que resultan en la liberación de lípidos, como un intento de bloquear el aumento de masa corporal (Xu et al, 2002).

Aún no se ha definido qué es lo que inicia la reacción inflamatoria, se han sugerido 3 causas posibles:

- 1) Hipoxia producida por la hipertrofia del adipocito, que impide su cercanía de los vasos sanguíneos, resultando en la liberación de IL-6 (Perseghin, Petersen et al. 2003).
- 2) Estrés oxidante provocado por el aumento en el suministro de glucosa a los adipocitos. La glucosa es tomada por las células endoteliales del estroma de los vasos sanguíneos e incrementa la producción de radicales libres lo cual promueve daño y dispara la respuesta inflamatoria (Perseghin, 2003).
- 3) Estrés celular, causado por la hipertrofia del adipocito, contribuyendo al malfuncionamiento del retículo endoplásmico y la activación de proteínas sensibles al estrés (Perseghin, Lattuada et al. 2003).

El estado inflamatorio tiene un impacto directo sobre complicaciones de la misma enfermedad, desde el desarrollo de resistencia a la insulina, hasta complicaciones vasculares.

En la obesidad, el tejido adiposo presenta una mayor cantidad de macrófagos infiltrados al tejido adiposo, esto está dado por la producción de la Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1 (MCP-1) por parte del adipocito, molécula encargada de generar quimiotaxis de macrófagos. Se considera que dichos macrófagos contribuyen en el proceso inflamatorio que presenta el tejido adiposo, mediante la producción desregulada de citocinas. Así mismo, se ha demostrado que la inhibición en la infiltración de macrófagos al tejido adiposo mejora dicha desregulación en la producción de citocinas, disminuyendo el estado inflamatorio (Gregor y Hotamisligil,

2011). Por lo tanto, la relación existente entre el adipocito y el macrófago es fundamental en el mantenimiento, aumento o disminución del estado inflamatorio.

Las citocinas producidas por macrófagos, como TNF- α , inducen lipólisis en el adipocito, liberando así una gran cantidad de ácidos grasos libres (AGLs), los cuales a su vez pueden activar al sistema inmune, ya que pueden fungir como ligandos de los receptores TLRs, particularmente TLR4, de manera en que esta activación se auto-perpetúa produciendo citocinas inflamatorias ya sea por parte del macrófago o del adipocito. Así mismo, la β -oxidación de ácidos grasos dará como resultado una mayor cantidad de diacilglicerol (DAG), que puede fungir como segundo mensajero y activar PKC, y con ello, fosforilar serinas en los sustratos del receptor de insulina y disminuir su actividad. Estos fenómenos contribuyen a disminuir la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina (Zhang y Mosser, 2008). Algunos mediadores inflamatorios como TNF- α , Interleucina-6 (IL-6), proteína C reactiva (CRP), MCP-1 e inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), están elevados en ratones y humanos obesos (Gregor y Hotamisligil, 2011). El TNF- α expresado en el tejido adiposo parece tener como origen a los macrófagos; mientras que los adipocitos contribuyen a los niveles sistémicos de MCP-1, IL-6 y leptina (Brahma, 2012). Se ha demostrado que la sobreexpresión de TNF- α en el tejido adiposo en modelos animales obesos contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina, ya que mientras que el TNF- α recombinante disminuye la sensibilidad a la insulina, los ratones que carecen de esta citocina muestran un incremento en la sensibilidad a esta hormona (Lumeng, 2007).

Adipocinas y sus características

Entre los mediadores endocrinos que son liberados por el tejido adiposo, se encuentran las adipocinas, que son secretadas en respuesta a cambios en los depósitos de triacilglicéridos en el adipocito y en respuesta a la inflamación sistémica y local. Dichas moléculas informan al organismo acerca de la energía almacenada y tienen una influencia sobre la función reproductiva, la presión arterial y su regulación, homeostasis energética, respuesta inmune y muchos otros procesos fisiológicos. Las adipocinas poseen propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias y juegan un papel crítico integrando el metabolismo sistémico con la función inmune. En estados de restricción calórica y ayuno, la producción de adipocinas proinflamatorias disminuye y las adipocinas antiinflamatorias incrementan, lo cual informa al organismo acerca del déficit energético y contribuye a la supresión de la función inmune. En individuos sanos, existe un balance entre las adipocinas pro- y antiinflamatorias, sin embargo, este balance puede descontrolarse en favor de un estado pro-inflamatorio a medida que el tejido adiposo se expande durante el desarrollo de la obesidad y como consecuencia, el estado pro-inflamatorio del tejido adiposo contribuye a un estado de inflamación crónica de bajo grado y a desórdenes metabólicos asociados a la obesidad. Estas condiciones se asocian con un incremento de riesgo en enfermedades metabólicas, DT2, complicaciones vasculares, (Mancuso, 2016).

El TNF- α en tejido adiposo es secretado por adipocitos y células del estroma, es responsable de causar resistencia a la insulina bloqueando los receptores de ésta hormona, tiene también impacto en las células beta-pancreáticas, inhibiendo la

secreción de insulina (Liu, 1998). En adipocito, TNF- α inhibe su habilidad de esterificar ácidos grasos, disminuye la secreción de adiponectina e inhibe el transporte de glucosa a las células hepáticas y la oxidación de ácidos grasos. Se sobre-expresa en los adipocitos de individuos obesos y se considera uno de los enlaces entre obesidad, diabetes e inflamación crónica. Es una citocina pro-inflamatoria que activa varias cascadas de señalización, incluyendo muchas de las vías críticas en inhibir la acción de la insulina. En modelos murinos de obesidad, la falta de TNF- α resulta en una mejora en la sensibilidad a la insulina y homeostasis de la glucosa, confirmando que su secreción como respuesta inflamatoria tiene un rol crítico en la regulación de la acción de la insulina en la obesidad. Claramente hay otros mediadores inflamatorios y citocinas que también se sobre-expresan en tejido adiposo y algunos otros tejidos en modelos experimentales de obesidad y en humanos. Sin embargo, el cómo contribuye cada mediador es poco claro, puesto que las citocinas y quimiocinas trabajan en redes y el efecto individual sobre la función metabólica depende de su lugar en la jerarquía de dichas redes; TNF- α tiene grandes efectos puesto que es de respuesta rápida y fuerte (Hotamisligil, 2006).

Por otro lado, la IL-6 circulante proviene aproximadamente en un 30% del tejido adiposo y su síntesis en el tejido adiposo visceral es aproximadamente 3 veces más alta que en el tejido adiposo subcutáneo. Altas concentraciones de ésta citocina provocan resistencia a la insulina, disminuyendo también la expresión del receptor de insulina, disminuye la adipogénesis, así como la secreción de adiponectina y visfatina, además, estimula la gluconeogénesis llevada a cabo en el hígado (Kuryszko, 2016).

Tratamiento farmacológico de la obesidad y DT2

Para el tratamiento de la diabetes, existen múltiples estrategias terapéuticas como es el caso de fármacos con actividad hipoglucemiante (sulfonilureas; glibenclamida e inhibidores de la DPP4; sitagliptina), así como antihiper glucémicos (biguanidas, tiazolinedionas, inhibidores de la alfa-glucosidasa). Sin embargo, todos estos han sido diseñados y se emplean con el objetivo de bajar los niveles de glucosa en sangre, y como consecuencia de ello, aminorar alguna complicación.

Del mismo modo, el tratamiento farmacológico para obesidad se enfoca en la inhibir a absorción de ácidos grasos (Orlistat), incrementar la beta-oxidación en los depósitos de tejido adiposo (agonistas de PPAR α) y disminuir los niveles de triglicéridos en sangre (hipolipemiantes como fibratos) Por lo tanto, es necesario encaminar la investigación hacia la búsqueda de alternativas terapéuticas que no solo corrijan los niveles glucémicos o las dislipidemias, sino que afecten también el origen de las complicaciones, el cual es el desbalance en los niveles de citocinas.

Antecedentes

Utilización de plantas con propiedades o acciones biológicas

Una de las fuentes importantes de obtención de nuevos compuestos son las plantas medicinales, utilizadas desde la antigüedad por estar al alcance del ser humano, hasta la fecha se transmite el uso de las mismas entre generaciones.

Entre los fármacos existentes hoy en día que han sido obtenidos de plantas, podemos encontrar al ácido acetil salicílico o Aspirina, obtenido de la corteza del sauce blanco o *Salix Alba*, el taxol o paclitaxel, con acción anti-tumoral y utilizado en quimioterapias, obtenido de *Taxus brevifolia*, e incluso la metformina, fármaco antidiabético obtenido de la planta *Galega Officinalis*, entre muchos otros.

Es necesario estudiar y confirmar los efectos terapéuticos, con el fin de agrupar plantas que tienen efectos similares y de ser posible conocer los principios activos responsables de la actividad biológica que disminuye los padecimientos.

Cucurbita ficifolia Bouché (*C. ficifolia*), conocida popularmente como “chilacayote”, es una de las especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de algunos padecimientos, entre ellos el de la diabetes. Se han llevado a cabo estudios en diversos modelos para determinar sus efectos. En el 2001, Acosta-Patiño y colaboradores administraron en pacientes con DT2 un extracto acuoso crudo de *C. ficifolia* y observaron un descenso significativo en los niveles de glucosa. En 2002, Alarcón y colaboradores (Alarcon-Aguilar, 2002) administraron un extracto acuoso (500mg/Kg peso del jugo de *C. ficifolia* vía intraperitoneal y oral) en modelo agudo en

ratones sanos y diabéticos, en donde observaron un descenso significativo en la glucemia (disminución de hasta 50 mg/dl). Este efecto también se observó en ratas a las cuales se les indujo diabetes experimental con aloxana bajo un esquema de tratamiento que involucra la administración diaria (500 mg/Kg de peso), vía oral, del jugo de *C. ficifolia* durante 14 días (disminución de glucosa de manera progresiva; de hasta 50 mg/dl). La administración oral de *C. ficifolia* (4 ml/kg), en pacientes con DT2 (con glucemias de entre 150-300 mg/dl), mostró disminución de glucosa en sangre de estos pacientes después de 3 h de tomar el extracto (Acosta-Patino, 2001). Desde el punto de vista fitoquímico, se propuso al D-quirositol (D-QI) como la molécula responsable del efecto hipoglucémico del fruto de *C. ficifolia*, mismo que fue utilizado para estandarizar un extracto acuoso para ser evaluado en un modelo murino de diabetes experimental. La administración oral del extracto acuoso (10 y 20 mg de extracto de *C. ficifolia*, con base en el contenido de DQI/kg; durante 30 días), causó disminución significativa de glucosa en sangre, además de aumentar los niveles de glucógeno hepático, hemoglobina total e insulina plasmática (Xia y Wang, 2006). Adicionalmente, el análisis histológico de páncreas de ratones que recibieron *C. ficifolia* reveló un incremento en el número de islotes pancreáticos. Proponiendo que las células pancreáticas expuestas a diferentes dosis de *C. ficifolia* aumenta su proliferación, la producción y liberación de insulina, lo cual podría explicar el efecto hipoglucémico de *C. ficifolia* (García-González, 2011). En el 2012, Hernandez-Rosado observó que el extracto acuoso aumenta la expresión de PPAR γ y PPAR α , así como de GLUT-1 en hepatocitos HepG2, así como de GLUT-4 y FATP-1 en adipocitos 3T3-L1, a pesar de que D-QI no mostró el mismo comportamiento. En el mismo año,

Miranda-Perez confirmó que tanto el extracto acuoso de *C. ficifolia* como D-QI, aumentan la expresión de insulina y Kir6.2, que hay un aumento de calcio intracelular y en la secreción de insulina en células RINM5F (Miranda-Perez, 2016).

A pesar de los diversos estudios con los que se cuentan acerca de los efectos de *C. ficifolia*, aún no se han llevado a cabo estudios que reflejen el efecto sobre una entidad en co-cultivo de adipocitos y macrófagos, siendo ambos tipos celulares de suma importancia en la regulación de procesos biológicos que se encuentran afectados en patologías asociadas a la obesidad.

VII. JUSTIFICACIÓN

La obesidad y el sobrepeso conllevan a diversas condiciones patológicas, entre ellas el síndrome metabólico, el cual puede derivar a diferentes complicaciones y patologías como es la diabetes. Por lo tanto, resulta importante abordar a la diabetes de manera integral y reducir el desarrollo de complicaciones vasculares.

C. ficifolia ha demostrado tener efecto anti-inflamatorio, hipoglucemiante y antioxidante, por lo cual podría ser una buena alternativa como co-adyuvante en el tratamiento de la diabetes y patologías relacionadas, como síndrome metabólico.

Debido a la relación que existe entre macrófagos y adipocitos en un tejido adiposo inflamado, a través de la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos, y de los AGLs secretados por la lipólisis en los adipocitos, estas moléculas producen un estado inflamatorio por la producción de citocinas, lo cual puede contribuir al desarrollo de complicaciones como la resistencia a la insulina, la disfunción endotelial y otras patologías. Por lo tanto, es interesante determinar el efecto de *C. ficifolia* tiene efecto sobre la interacción entre adipocitos y macrófagos, lo que nos conducirá a determinar su posible efecto a nivel de moléculas importantes en el metabolismo (PPARs) y en la respuesta inmune (citocinas) en un modelo *in vitro* que asemeja un tejido adiposo inflamado.

VIII. HIPÓTESIS

Cucurbita ficifolia modifica el perfil inflamatorio y el balance energético, lo que promueve una mejora en la respuesta inflamatoria por parte del macrófago, generando un efecto benéfico.

IX. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto de *Cucurbita ficifolia* sobre el perfil inflamatorio de macrófagos, así como de PPARs, sometidos a un sistema de co-cultivo con adipocitos.

X. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estandarizar el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* mediante la identificación y cuantificación de al menos un compuesto químico.
2. Determinar el efecto de *Cucurbita ficifolia* sobre la expresión de mediadores inflamatorios (citocinas) en macrófagos, sometidos a co-cultivo con adipocitos.
3. Determinar el efecto de *Cucurbita ficifolia* sobre el balance energético establecido por PPARs, en adipocitos sometidos a co-cultivo con macrófagos.

XI. VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*

El fruto de *C. ficifolia* es obtenido del municipio de Acolman, Estado de México.

El fruto se limpió, se removió la cáscara y se eliminó el contenido de semillas. Se cortó en rebanadas delgadas para su deshidratación a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar. Una vez seco el material vegetal, se trituró y 400 g del material resultante se sometieron a una maceración con 4 L de agua durante 72 h dentro de una campana de flujo laminar. El material vegetal fue separado de la mezcla acuosa por medio de filtración (Whatman No. 4, Merck) y concentrado en un rotavapor (Heidolph Laborota 4000) hasta llevarse a sequedad. El extracto fue liofilizado y almacenado para su posterior uso a -70 °C.

Análisis fitoquímico del extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*

Bipartición con Acetato de Etilo

Se realizaron biparticiones al extracto completo. Separando los compuestos del extracto completo (10g) en una fase acuosa (200 mL) y una fase orgánica (acetato de etilo, 200 mL). La mezcla fue depositada en un embudo de separación donde se dejó por 30 minutos para que se separaran las fases que fueron recolectadas por separado. El disolvente de cada fase fue eliminado por destilación a presión reducida en un rotaevaporador (Laborota 4000, Heidolph). La segunda bipartición se realizó a partir de una extracción acuosa al fruto fresco licuado, sin concentrar, de igual manera se

tomó el mismo volumen de acetato de etilo que de extracto acuoso, se sometió a separación en un embudo, se recuperaron las 2 fases por separado y se concentraron.

Extractos de *Cucurbita ficifolia*

Para obtener estándares aislados de los compuestos que conforman el extracto de *C ficifolia*, se realizaron extracciones sucesivas con disolventes de polaridad ascendente con *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, metanol y agua.

El fruto fue colectado, se removió la cáscara y el contenido de semilla para posteriormente realizar cortes en rebanadas delgadas para su deshidratación a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar. Una vez deshidratado el fruto, se realizó la extracción con los disolventes anteriormente mencionados.

Primero se dejó macerar el fruto seco en *n*-hexano (4 L) por 24 horas, se recuperó la fase líquida y se filtró y concentró en un rotavapor a aproximadamente 40°C.

El material vegetal se recuperó, se llevó nuevamente a sequedad y se dejó macerar por 24 horas en acetato de etilo (4 L). Se recuperó la fase líquida, se filtró y se concentró a 40 °C.

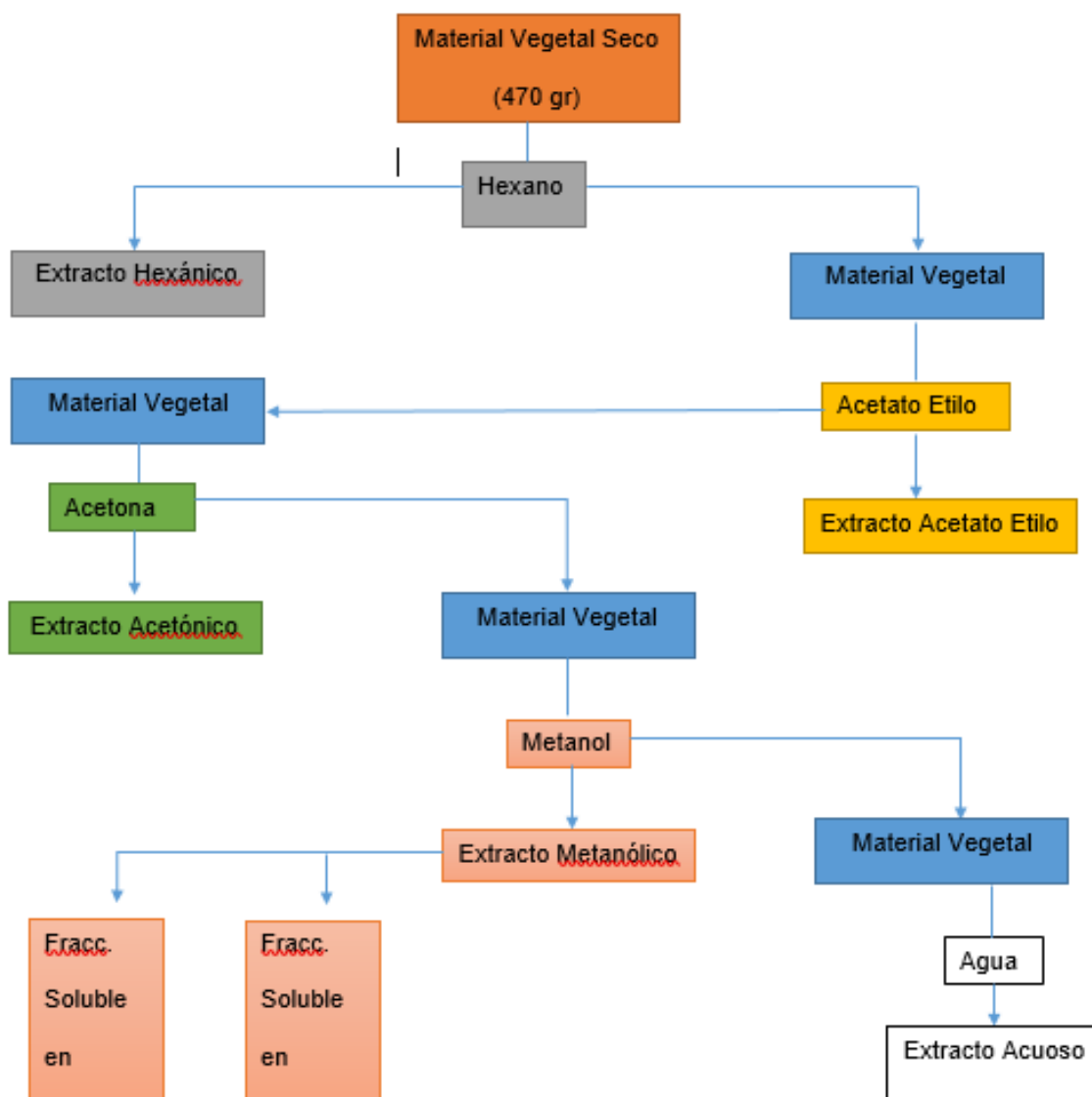
Nuevamente el material sólido se recuperó, se llevó a sequedad y se dejó macerar por 24 horas en Acetona (4 L), se recuperó la fase líquida, se filtró y se concentró en un rotavapor a aproximadamente 40°C.

El fruto una vez seco, se dejó macerar en Metanol por 24 horas, se recuperó la fase líquida, se filtró y concentró en un rotavapor a 50°C.

Una última maceración se realizó con agua (5 L) se llevó a cabo, por 24 horas, la fase líquida se recuperó, filtró y concentró a 50°C.

Todos los extractos obtenidos fueron liofilizados, sellados y guardados a -70°C.

Extracciones sucesivas con disolventes de polaridad ascendente



De los extractos obtenidos, se pesaron 3 mg y se disolvieron en 3 ml de Metanol para ser analizados en el equipo de CLAR.

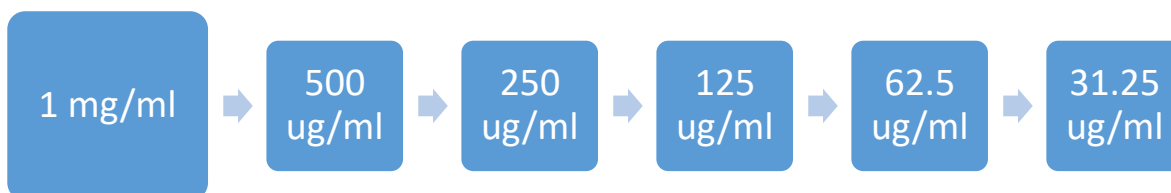
El análisis de CLAR fue desarrollado utilizando el equipo de cromatografía líquida de alta resolución Waters 2695, equipado con un detector de arreglo con fotodiodo y el software Empower Pro (Waters Corporation). Se utilizó una columna fase reversa Supelcosil LC-F (4.6 mm – 250 mm i.d., tamaño de partícula de 5- μ m) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, E.U.A.). La fase móvil consistió en una solución al 0.5% de ácido trifluoroacético (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B). El sistema de gradiente fue el siguiente: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B, 4-20 min, 30% B; 21-23 min, 50% B 14-15 min; 24-25min, 80% B; 26-27 100% B; 28-30min, 0% B. La tasa de flujo se mantuvo a 0.9 ml/min y el volumen de inyección fue de 10 μ L. La absorbancia se midió a 330 nm. La salicina fue identificada por comparación de los tiempos de retención y espectro UV con estándares comerciales de referencia (Sigma-Aldrich).

Cuantificación de Salicina en Extractos obtenidos de *Cucurbita ficifolia*

Con base en estudios llevados a cabo en el grupo de trabajo, se determinó por RMN que uno de los compuestos mayoritarios correspondía al compuesto Salicina, un glucósido alcohólico. En la literatura ha sido reportada su actividad anti-inflamatoria.

Con un estándar comercial, se realizó una curva patrón por medio de lecturas en el CLAR.

Se pesaron 3 mg de Salicina para llevaros a una solución de 1 mg/ml y de ésta solución se realizaron diluciones sucesivas, llevando las soluciones a la mitad de la concentración, de modo que obtuvimos 5 diluciones de las siguientes concentraciones:



Se introdujeron las diluciones al HPLC, lo cual nos arrojó los siguientes Tiempos de Retención (RT) y áreas bajo la curva, con lo que pudimos obtener una curva de calibración.

Cultivo de las líneas celulares RAW264 y 3T3-L1.

Se utilizaron macrófagos de la línea RAW 264.7 ATCC en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

También se utilizaron fibroblastos de la línea celular 3T3-L1 ATCC, en medio DMEM suplementado con 2Mm de glutamina y 10% de suero de neonato de ternera. Una vez que llegaron al 70-80% de confluencia se diferenciaron a adipocitos, estimulándolos con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, adicionando 0.5 Mm de IBMX (3 Isobutil-1-MetilXantina), dexametasona 0.25uM e Insulina 1 ug/ml por dos días, al tercer día se removió el medio y se les trató nuevamente con medio, ahora sin IBMX ni dexametasona, pero manteniendo la suplementación con insulina por 2 días más. Posterior al día 4 y en adelante, el cultivo se mantuvo con DMEM al 10% de suero

fetal bovino (SFB), cambiando medio cada 2 días. Los adipocitos se utilizaron al octavo día de estimulación.

Las líneas celulares se cultivaron y proliferaron de manera separada para posteriormente ser usadas en el co-cultivo.

Co-cultivo de líneas celulares RAW264.7 y 3T3-L1

El co-cultivo de macrófagos y adipocitos se realizó mediante dos sistemas diferentes. En el primer sistema, los adipocitos fueron cultivados y diferenciados independientemente y fueron utilizados al octavo día de diferenciación, los macrófagos RAW 246.7 se establecieron a la par de manera independiente, se separaron en distintos grupos para aplicárseles los tratamientos correspondientes.

Los grupos fueron los siguientes:

- Testigo: Líneas celulares sin intercambio de medio y sin tratamiento.
- Control negativo: no se les aplicará ningún tratamiento, pero se les intercambiaron los medios de cultivo.
- Grupo Experimental. Tratamiento con extracto de *C. ficifolia*.

Posterior a las 24 horas del tratamiento, se intercambiarán los medios de cultivo de una línea celular a la otra y después de 30 minutos se realizará el lisado de éstas para su extracción de RNAm.

En el segundo sistema, utilizamos los dispositivos Corning Costar Transwell con una membrana de policarbonato y poro de 0.4 μm para co-cultivo celular (CLS3450 SIGMA) para separar los adipocitos de los macrófagos. Se cultivó la línea 3T3-L1 en

placas de 6 pozos, y los macrófagos RAW 264.7 se cultivaron en el dispositivo colgante o inserto. De este modo, las células comparten el medio de cultivo.

Pruebas de viabilidad celular por medio de ensayo con MTT

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de MTT reportada por Mosman (1983). Este ensayo se basa en la capacidad de enzimas deshidrogenasas presentes en la célula, como la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, la cual reduce el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2-5difeniltetrazolio (MTT) en formazán, un compuesto de color azul, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células que fueron sometidas a tratamientos. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se sembraron 5000 células/pozo en placa de 96 pozos con medio D-MEM, se incubaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Después de 24 h, las células se lavaron con PBS y posteriormente se les agregó medio de cultivo y los extractos evaluados a distintas concentraciones. En el caso del extracto acuoso, se utilizaron concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml, para el extracto proveniente de la Fracción de Acetato de Etilo, se utilizaron concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 µg/ml. Se incubaron las células con los tratamientos correspondientes por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio y se agregó una solución de 0.1 mg/ml de MTT en PBS a pH 7.5. Se incubaron por 3 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se les retiró el medio y se le agregó 200 µL de una solución de HCl 0.04M en 2-isopropanol durante 15 min, para disolver el formazán. El cambio de absorbancia se

leyó a 570 nm en un lector de placas de ELISA. La funcionalidad se determinó con base en el porcentaje del cambio de extinción de MTT.

Cuantificación de los niveles de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 en el medio de cultivo.

Los niveles de TNF-A, IL-6, IL-1 β , IL-10 en el medio de cultivo se cuantificaron por medio de kit de ELISA adquiridos de manera comercial (Biolegend), siguiendo las instrucciones descritas por el proveedor.

Análisis de expresión de RNAm de FATP1, GLUT-4, PPAR γ , PPAR α , TLR-4, Adiponectina, TNF- α , IL-6, IL-10.

Se extrajo RNA total mediante el método de TRIZOL y se cuantificó con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para la síntesis del DNA complementario (cDNA), se utilizó el estuche ImProm II (Promega) a partir de 2 μ g de RNA total. La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el siguiente programa de ciclos: inicio 25 °C por 5 min, seguido por la extensión a 42 °C por 55 min y, por último, se detuvo la reacción inactivando la enzima calentando a 70 °C por 15 min y enfriando a 4 °C por 5 min.

El cDNA se amplificó mediante la enzima DNA polimerasa del kit de “DNA master SYBR Green 1” para cada uno de los genes a estudiar, con el equipo Rotor Gene 3000 de Corbett Research. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 μ L estuvo compuesta por oligonucleótidos 0.5 Mm de los genes descritos previamente y la mezcla de reacción 1X que contiene la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂. Para ambas líneas celulares se utilizaron cebadores diseñados

a partir de secuencias de genes de *Mus musculus* y se utilizó 36B4 como gen constitutivo, las secuencias de los genes se describen en la tabla 1. Las condiciones bajo las cuales se realizó esta reacción fueron las siguientes: desnaturalización, 95°C 10 segundos, alineamiento 61°C por 7 segundos y elongación a 71°C por 10 segundos.

Tabla 1. Genes y cebadores utilizados para el análisis de expresión en células 3T3-L1 y RAW 264.7

Genes 3T3-L1	Primer Forward	Primer Reverse
36B4 Gene Bank NM_007475.2	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT	CCGCAGGGGCAGCAGTGGT
PPARγ Gene Bank NM_011146.1	CCAGAGTCTGCTGATCTGCG	GCCACCTCTTTGCTCTGCTC
GLUT-4 Gene Bank NM_009204.2	GATTCTGCTGCCCTTCTGTC	ATTGGACGCTCTCTCTCCAA
FATP-1 Gene Bank NM_011977.3	ACCAGTGTCAGGGGTACAG	TGTCTCCAGCTGACATGAG
Adiponectina Gene Bank NM_009605.4	GGCTCTGTGCTCCTCCATCT	AGAGTCGTTGACGTTATCTGCATAG
TNF-α Gene Bank NM_013693.1	CCTCCCTGTCA TCAGTTCTA	ACTTGGTGGTTTGCTACGAC
IL-6 Gene Bank NM_000071.1	TTCCATCCAGTTGCCTTCTT	CAGAAT TGCCATTGCACAAC
IL-1β Gene Bank NM_000068.7	TATGTCTTGCCCGTGGAGCTT	GTCACAGAGGACGGGCTCTT
IL-10 Gene Bank NM_000067.6	CAGAGCCACATGCT	GTCCAGCCTGGTCCT

Prueba de tolerancia a la glucosa

Se realizó ratones machos de la cepa CD-1. Se hicieron grupos de 4 ratones para tener de este modo un grupo Control, al cual se dejó sin tratamiento, el grupo experimental al que se le administró extracto acuoso de *C. ficifolia* (250 mg/kg), y un

grupo Control positivo, al que se le administró Glibenclamida (250 mg/kg). Inicialmente se tomó la glucemia al tiempo 0, en ayunas (12 horas previas de ayuno), posteriormente se administró glucosa (2 g/kg de peso) por vía intragástrica y se midió la glucosa a distintos tiempos (0, 30, 60, 120 minutos).

XII. RESULTADOS

Rendimientos de Extractos y Fracciones

En la tabla 2 se muestra el rendimiento obtenido de los extractos.

Tabla 2. Pesos obtenidos de extractos y fracciones

EXTRACCIÓN	Peso Fruto Seco.	Peso neto
Maceración Acuosa	130	6
Acuoso Licuado	9300 (peso fresco)	30
Fracción AcOEt	10 (ext. Acuoso)	0.3
Fracción AcOEt licuado	----	100
Hexano	470	5
AcOEt	470	3
Acetona	470	4.5
MeOH	470	6.7
Acuoso 3	470	20

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Debido a que el análisis cromatográfico del extracto acuoso íntegro no permite observar adecuadamente los metabolitos secundarios, se decidió resuspender 100 mg de extracto completo en 5 ml de Metanol, dejando a una concentración total de 20 mg/ml. Al hacer esto, se observó cómo se incrementan los picos que se presentan en el cromatograma 2, en la fracción MeOH.

Una vez visto esto, se optó por llevar a cabo la misma estrategia con la fracción de MeOH pero ahora resuspendiendo la fracción seca en acetona. Este disolvente que es menos polar, nos permitió incrementar aún más estos compuestos (Figura 1, Anexo 1). Todo esto indica que el extracto completo contiene varios compuestos químicos,

pero a concentraciones extremadamente bajas, puede ser que el contenido principal sea predominantemente carbohidratos, puesto que no se observan en U.V.

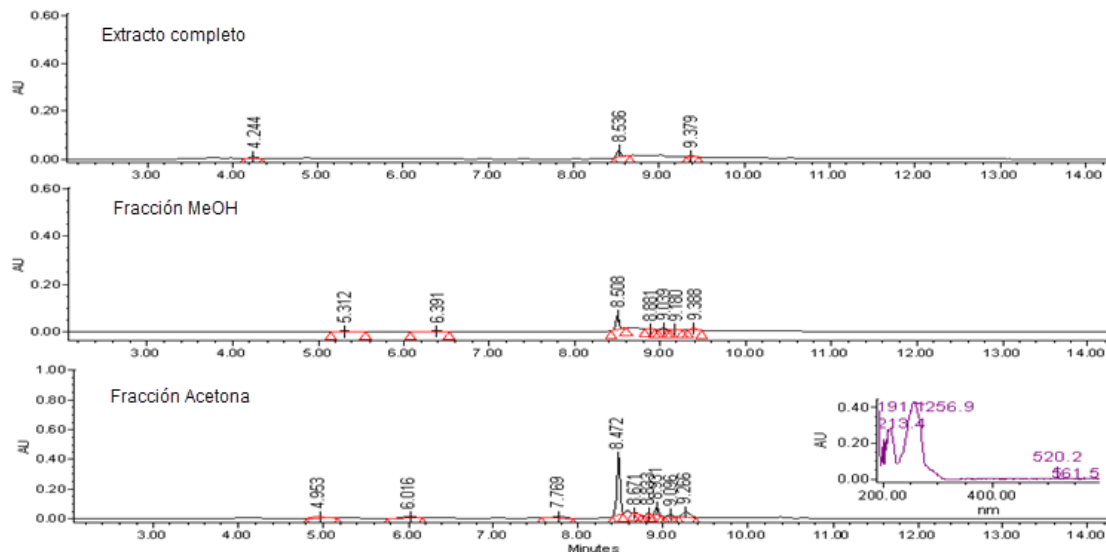


Figura 1. Cromatogramas del extracto acuoso completo, Fracción Metanólica y Fracción acetónica, con su respectivo espectro de absorción, visto a 260 nm.

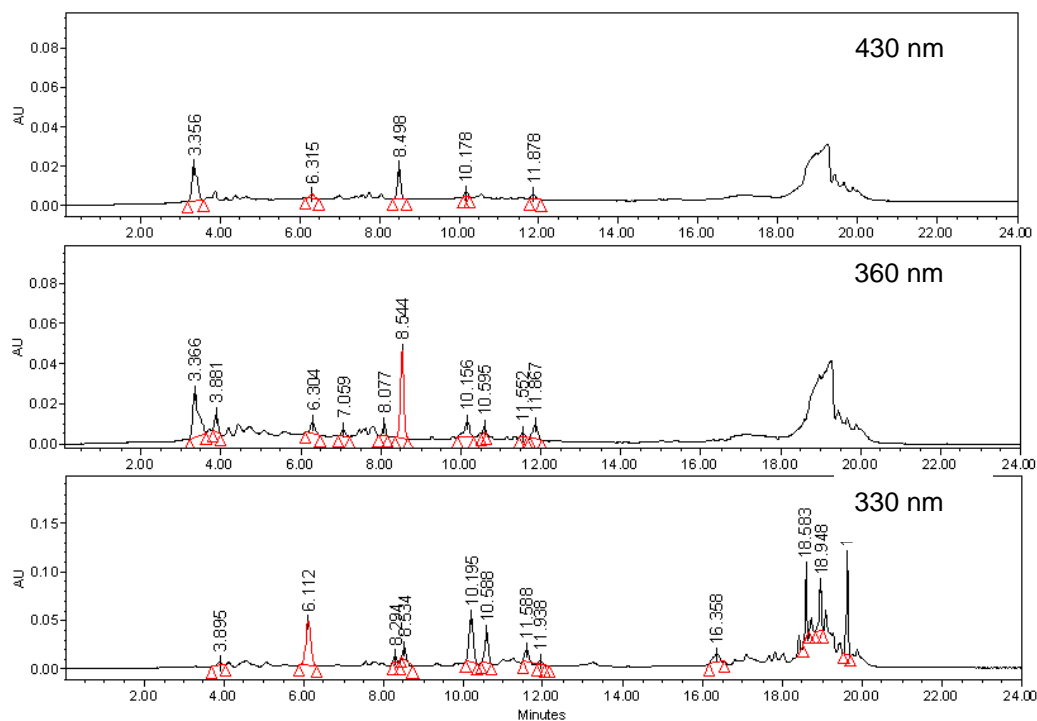


Figura 2. Cromatograma del extracto acuoso analizadas a 430, 360 y 330 nanómetros

Visualizando los cromatogramas a distintas longitudes de onda (Figura 2, Anexo 2), podemos observar que a 430 nm se apreciarían normalmente clorofilas y no están presentes en el extracto, puesto que es un extracto del fruto. A 360 nm únicamente hay trazas de flavonoides, a los 330 nm se observan varios compuestos, posiblemente fenilpropanoides.

A 310 nm se observan los mismos compuestos que a 330 y posiblemente cumaroides y ácidos orgánicos. A los 280 nm aparecen nuevos picos, seguramente de compuestos de tipo fenólicos, como los glucósidos alcohólicos (entre ellos salicina) y lignanos.

Los compuestos mayoritarios se pueden observar en el rango de tiempo de retención de 8.3 - 9.3, cuyas absorbancias máximas oscilan entre los 230-270 nm (Figura 3).

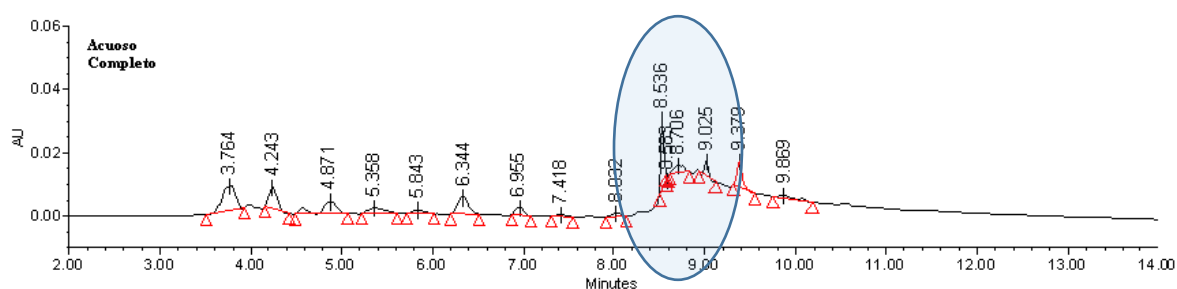


Figura 3. Compuestos presentes en el extracto acuoso a sus distintos tiempos de retención, vistos a 260 nm

Puesto que el extracto acuoso es rico en carbohidratos y por la naturaleza de su disolvente, es proclive a la proliferación de microorganismos. Por esta razón se llevó a cabo una licuefacción del fruto limpio y sin semilla ni cáscara, filtrando la fase acuosa obtenida, reduciendo así el tiempo de macerado en Agua. Por medio de CLAR pudimos comparar los componentes químicos de éste extracto con el extracto realizado por maceración (Figura 4).

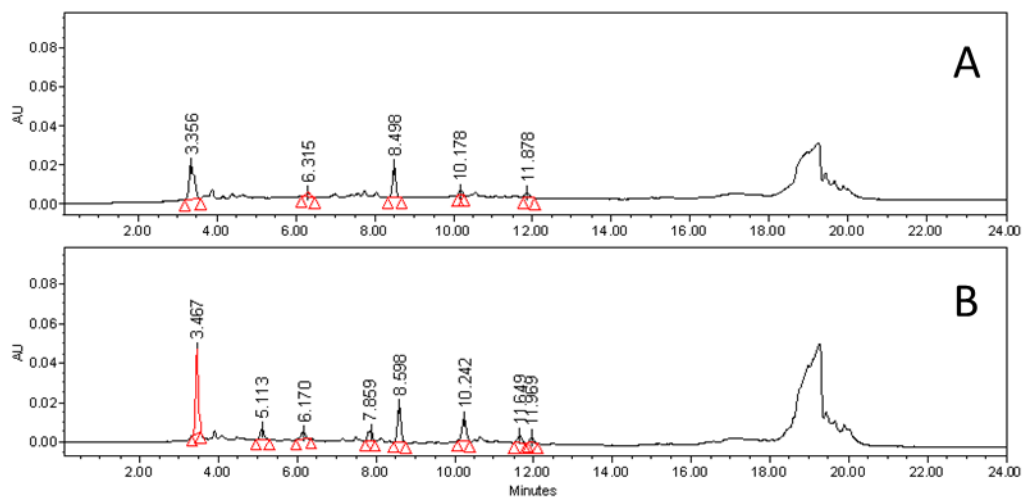


Figura 4. Cromatogramas comparativos de extracto acuoso por maceración (A) vs. Extracto licuado acuoso (B), observado a 260 nm.

En el siguiente cromatograma obtenido por CLAR podemos comparar los distintos compuestos obtenidos a los distintos Tiempos de Retención (RT) tanto en el extracto acuoso obtenido por maceración, como del extracto acuoso obtenido por licuefacción, con sus respectivas biparticiones con acetato de etilo.

El extracto acuoso obtenido por maceración presenta compuestos que el licuado no contiene, sin embargo, en los tiempos de retención de 8.5, 9.0 y 9.5 minutos, observamos compuestos presentes en todos los extractos, en el caso del extracto licuado y las fracciones incluso en mayor proporción.

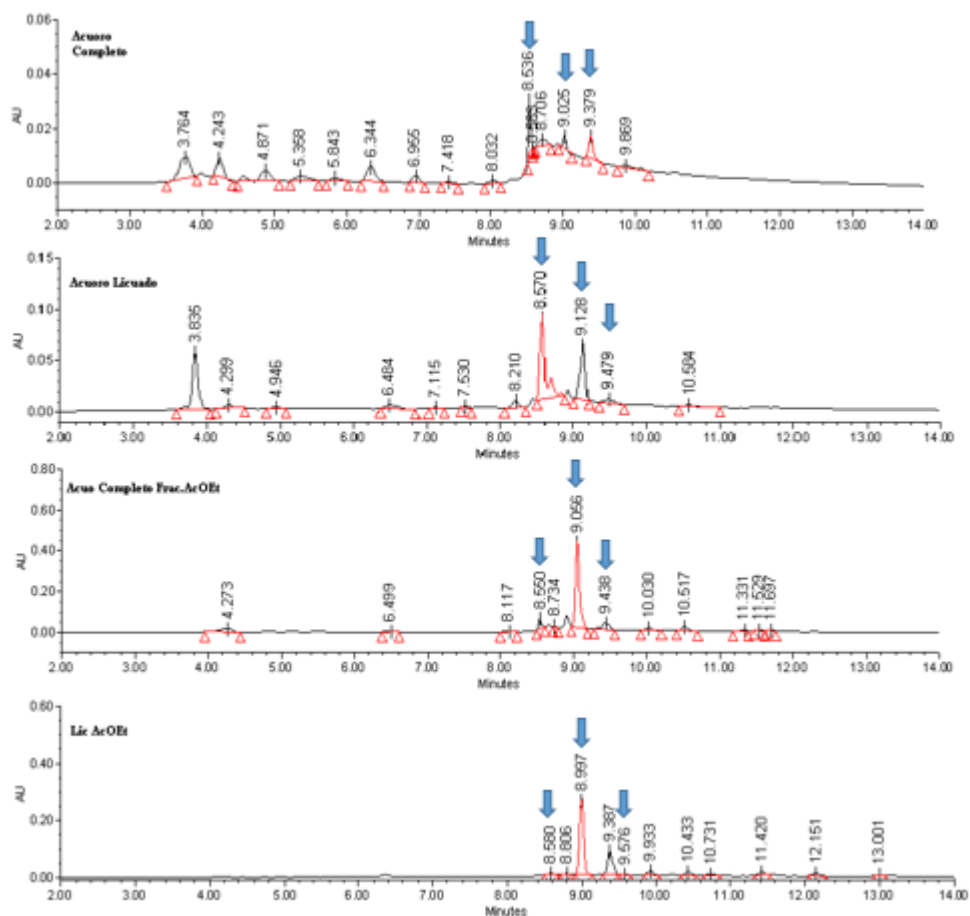


Figura 5. Cromatograma comparativo de Extracto Acusos por Maceración, Extracto acusos por licuefacción y sus respectivas fracciones obtenidas por Bipartición con Acetato de Etilo. En las flechas se indican los compuestos en común.

Puesto que por lo menos 3 de los compuestos mayoritarios se encuentran constantes en los extractos y en sus biparticiones con acetato de etilo (Figura 5), resultaría conveniente corroborar si en la fracción de acetato de etilo hay actividad biológica para de este modo, acotar los compuestos que posiblemente sean responsables de las actividades biológicas que presenta el extracto acusos.

Cromatografía en Capa Fina

Se realizaron cromatografías en capa fina para comparar la composición o presencia de compuestos en los distintos extractos obtenidos, tanto en las fracciones obtenidas, como en los distintos extractos obtenidos con solventes de polaridad ascendente.



Fase Reversa, Sistema 8:2 TFA:Acetonitrilo.

Carriles:

- 1.- Completo en MeOH
- 2.- Glucósido Alcohólico β -alcohólico (salicina)
- 3.- Frac AcOEt
- 4.- Ext Acetónico
- 5.- Salicina
- 6.- Cumárico

Figura 6. Cromatoplaça Fase Reversa, distintos extractos y fracciones producto de biparticiones.

Los extractos de *C. ficifolia* obtenidos con solventes de menor polaridad, como Acetato de Etilo, Fracción de CH_2Cl_2 y Hexano, de acuerdo a la CCF presentan alrededor de 3 compuestos en común, que en el extracto acuoso, metanólico y acetónico no se pueden separar visiblemente en la cromatoplaça. Estos compuestos tienen una corrida similar al compuesto de referencia; β -sitosterol, un esteroles, y ácido ursólico. Es de esperarse que estos compuestos como terpenos o compuestos de poca polaridad se encuentren en los extractos de menor polaridad como los anteriormente mencionados.

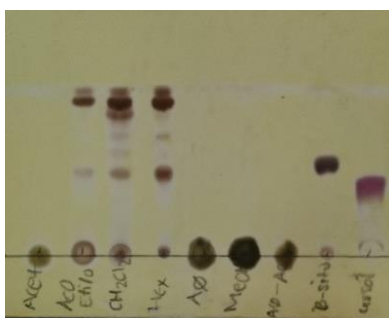


Figura 7. Cromatoplaça de extracto Acetónico (Carril 1), Acetato de Etilo (Carril 2), Fracción de Dicloro Metano obtenida de extracto acetónico (Carril 3), Extracto Hexánico (Carril 4), Extracto Acuoso (Carril 5), Metanólico (Carril 6), Acuoso-acetónico (Carril 7), referencias de Beta-sitosterol (Carril 8) y ácido ursólico (Carril 9).

Cuantificación de Salicina en Extractos obtenidos de *Cucurbita ficifolia*

Con base en estudios llevados a cabo en el grupo de trabajo, se determinó por RMN que uno de los compuestos mayoritarios correspondía al compuesto Salicina, un glucósido alcohólico. En la literatura ha sido reportada su actividad anti-inflamatoria.

Se introdujeron las diluciones al CLAR, lo cual nos arrojó los siguientes Tiempos de Retención (RT) y áreas bajo la curva, con lo que pudimos obtener una curva de calibración.

Tabla 3. Curva de Calibración de Salicina

Concentración	Tiempo Retención	A1	A2	A3	Promedio
31.25	5.39 min	43510	41272	41274	42018.6667
62.5	5.39 min	93429	83249	87667	88115
125	5.39 min	172787	172787	178967	174847
250	5.39 min	312139	350214	326506	329619.667
500	5.39 min	683394	722840	695547	700593.667

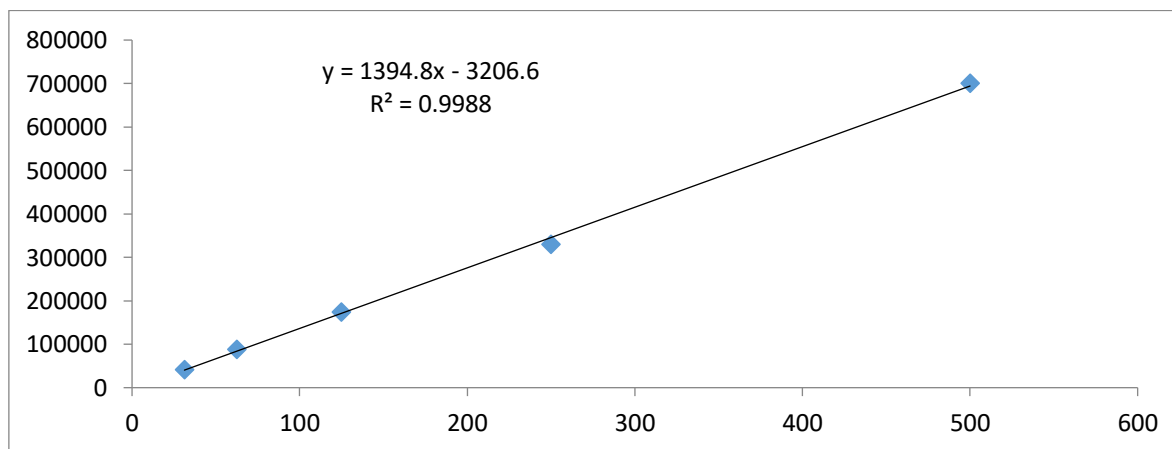


Figura 8. Curva de calibración de salicina.

Tomando en consideración las áreas bajo la curva del pico de salicina, se obtuvo la ecuación $Y=mx+b$ $Y=1394x-3206$. Con esta ecuación pudimos calcular la concentración de salicina que contiene nuestro extracto.

Tabla 4. Concentración de Salicina presente en Extractos acuosos de *Cucurbita ficifolia*.

Muestra	Tiempo de retención	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	µg Salicina/gr extracto
Extracto Acuoso 1	5.3	8945	8945	9193	9027.66	877
Extracto por licuefacción	5.3	25	30	35	30	232
Extracto Acuoso Post-maceración	5.3	No detectada	No detectada	No detectada	No detectada	No detectada

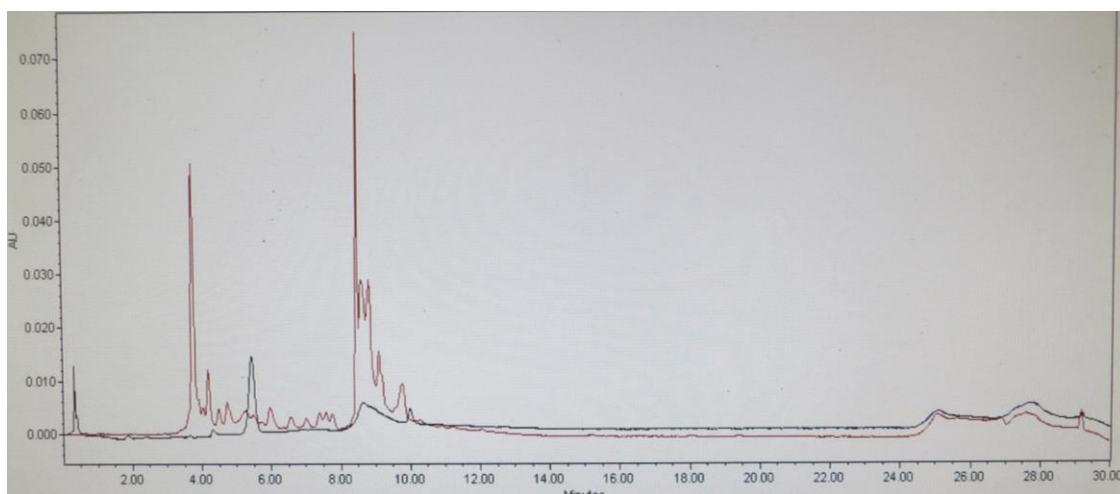


Figura 9. Cromatograma comparativo de salicina contra Extracto Acuoso de *Cucurbita ficifolia*

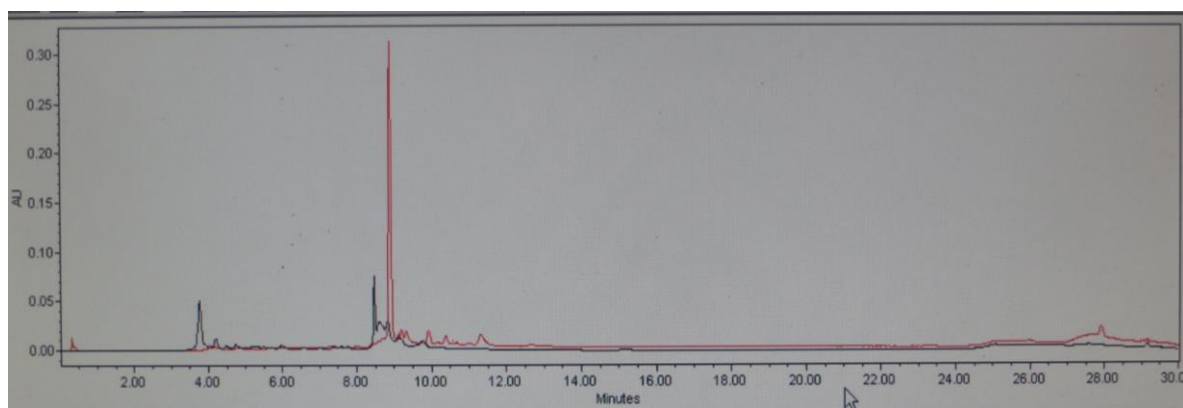


Figura 10. Cromatograma comparativo de extracto Acuoso contra Fracción de Acetato de Etilo de *C. Ficifolia*

Pruebas de funcionalidad celular con MTT.

Se realizaron pruebas de funcionalidad celular, posterior al tratamiento con distintas concentraciones, tanto del extracto Acuoso de *C. ficifolia* (Figura 11), así como de la fracción de Acetato de Etilo, en la línea celular de macrófagos 264.7 y en la línea 3T3-L1. En las gráficas (Figura 11 Y 12) se muestra el porcentaje de células que conservan funcionalidad después del tratamiento.

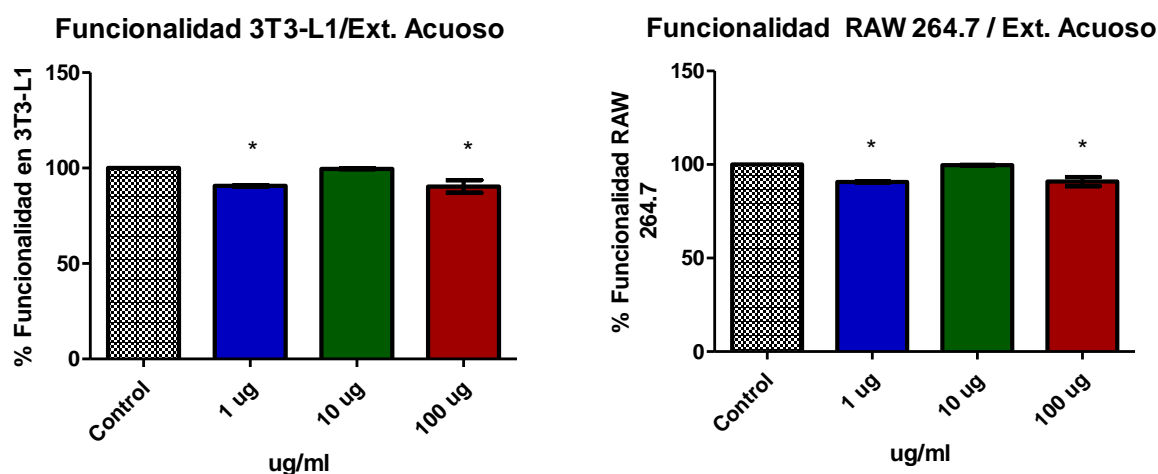


Figura 11. Ensayo de MTT para viabilidad celular de macrófagos 264.7 con tratamientos a 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de extracto acuoso. $n=5$ Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* $p<0.05$).

Se observó una diferencia significativa entre el porcentaje de funcionalidad de los tratamientos a 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respecto al control, en donde la funcionalidad es del 100%. La concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ del extracto acuoso conserva un mayor porcentaje de células viables (Figura 11), por lo tanto, podemos concluir que una concentración segura para utilizarse como tratamiento en nuestras células es de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, el tratamiento de las células con la fracción de acetato de etilo, indicó que la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, se conserva un mayor porcentaje de células viables, y a las concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ se da una pérdida significativa de la viabilidad celular en los adipocitos y macrófagos, con respecto al control (Figura 12), por lo tanto, es probable que la fracción obtenida con acetato de etilo contenga compuestos con potencial actividad citotóxica.

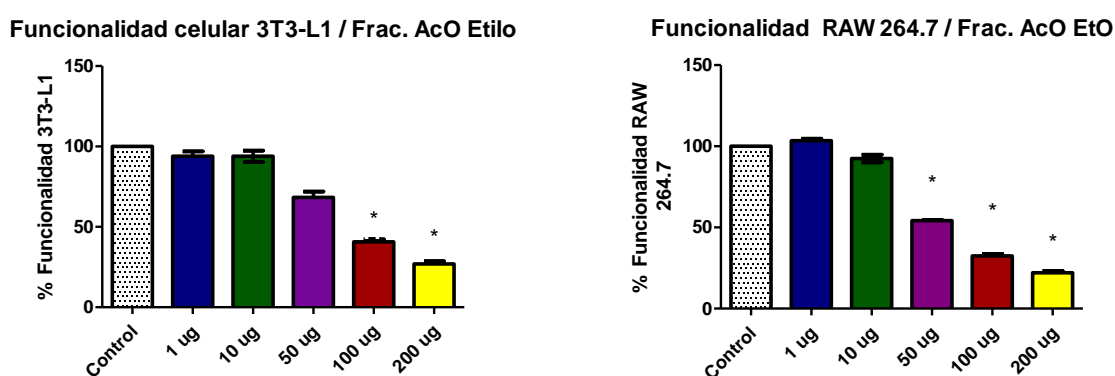


Figura 12. Ensayo de MTT para funcionalidad celular de macrófagos RAW 264.7 con tratamientos a 1, 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de extracto acuoso de *C. ficifolia* y fracción de Acetato de Etilo. $n=5$, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* $p<0.05$).

Ensayo Agudo *In vivo* de tolerancia a la glucosa.

Considerando que el antecedente directo de *Cucurbita ficifolia* que permitió el presente planteamiento es la actividad hipoglucemiante, se evaluó la fracción de acetato de etilo del extracto de *Cucurbita Ficifolia* mediante un ensayo de tolerancia a la glucosa en ratones sanos de la cepa CD1.

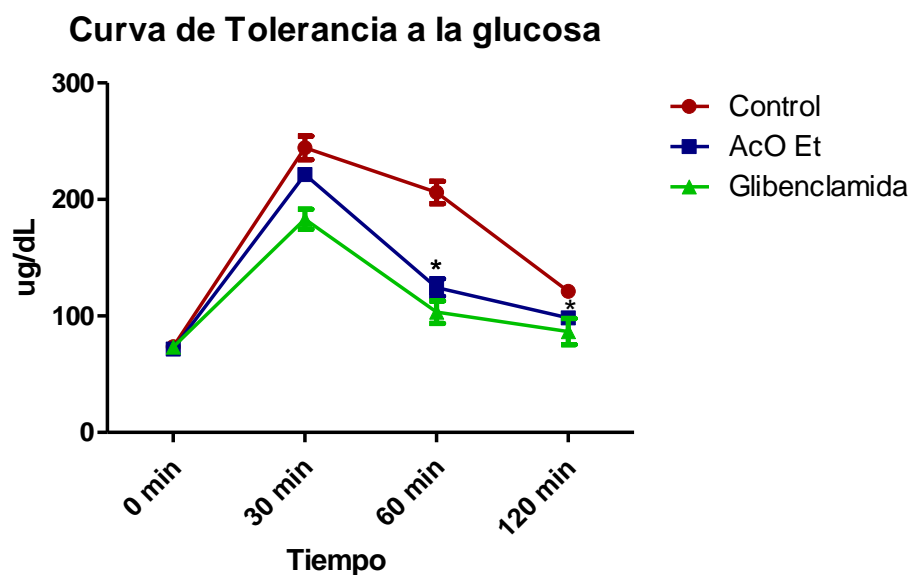


Figura 13. Curva de tolerancia a la glucosa a 30, 60 y 120 minutos. Media \pm E.S.M. n=4, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* $p < 0.05$).

La fracción de acetato de etilo tuvo menor efecto hipoglucemiante en comparación con el control positivo, glibenclamida, sin embargo, tuvo una disminución significativa con relación al control a los 60 y 120 minutos.

Cinética de producción de TNF- α

Para establecer el tiempo en el que se da una mayor secreción de TNF- α , se realizó una cinética de producción de TNF- α en macrófagos 267.4, estimulados por 2 horas con lipopolisacárido (LPS), como grupo control. Para el grupo experimental, las células se sometieron a un tratamiento de *C. ficifolia*, durante 30 minutos, 1, 3, 6, 12 y 24 horas. Los niveles de TNF- α se cuantificaron por medio de un ensayo de ELISA.

Como podemos observar en la Figura 14, el tratamiento con extracto acuoso de *C. ficifolia* disminuye los niveles de producción de TNF- α y el tiempo de mayor producción de TNF- α se logra a las 6 horas en ambos casos.

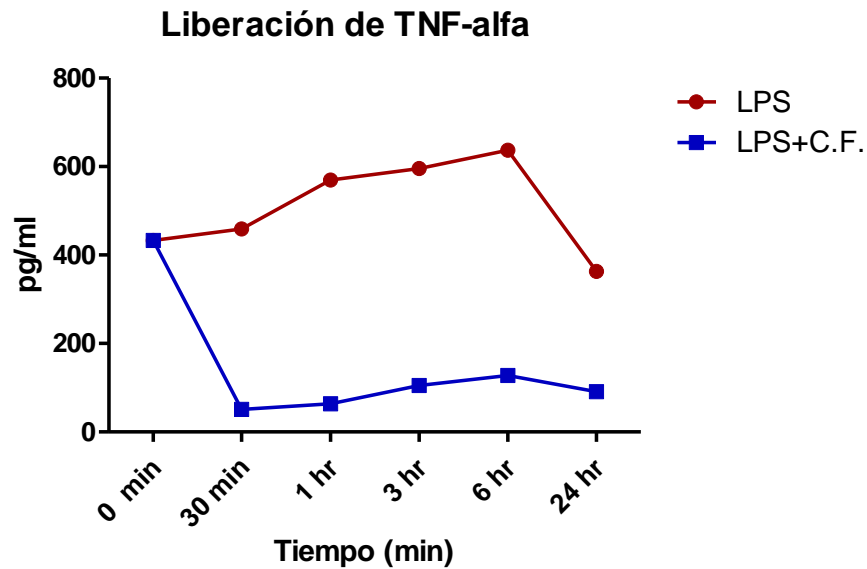


Figura 14. Cinética de producción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS sin tratar, y con tratamiento de *C.Ficifolia*. 10 μ g/ml.n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

Aparentemente el tiempo de mayor producción de TNF- α por parte de los macrófagos es a las 6 horas y cuando se aplica el tratamiento de *C. ficifolia* a 10 μ g/ml se observa un descenso drástico en su liberación desde los 30 minutos, manteniéndose hasta las 24 horas.

Cinética de expresión de PPAR γ y GLUT-4

Se realizó una cinética de expresión de PPAR γ y GLUT-4 en adipocitos 3T3-L1 tratados con una concentración de 10 μ g de extracto acuoso de *C. ficifolia* para determinar el tiempo de expresión máxima y establecer a qué tiempo sería conveniente realizar las mediciones subsecuentes (Figuras 15 y 16).

Expresión relativa de mRNA PPAR γ /36B4 en adipocitos 3T3-L1

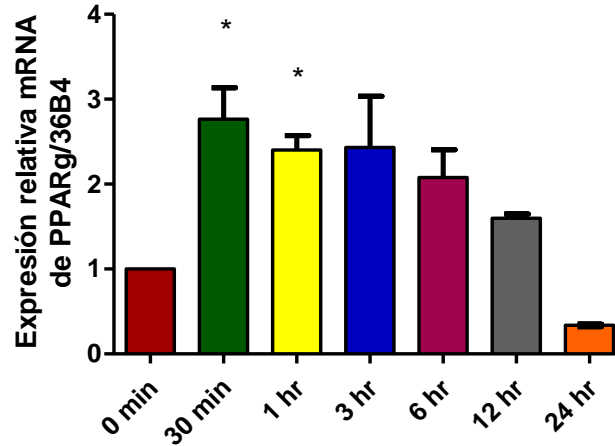


Figura 15. Cinética de expresión de PPAR γ en adipocitos 3T3-L1 tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia* a una concentración de 10 μ g/ml a 30 minutos, 1, 3, 6, 12 y 24 horas. n=3 Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

Se puede apreciar un incremento significativo en la expresión de PPAR γ a los 30 minutos con una tendencia al descenso a tiempos más largos, a las 24 horas se observa una disminución significativa con respecto al tiempo inicial (Figura 15). En el caso de GLUT-4 se observa un incremento significativo a los 30 minutos y un decremento significativo a la 1 y 3 horas y aparentemente se re-establecen concentraciones cercanas a las basales de las 6 a 24 horas (Figura 16).

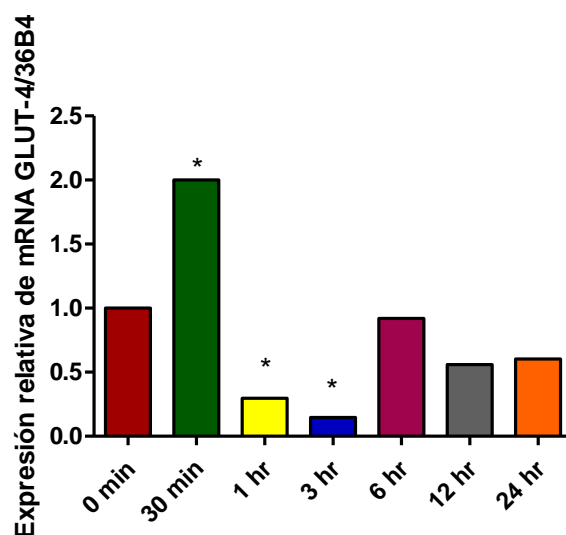


Figura 16. Cinética de expresión de GLUT-4 en adipocitos 3T3-L1 tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia* a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 30 minutos, 1, 3, 6, 12 y 24 hrs. $n=3$, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* $p<0.05$).

Dados los resultados de la cinética de expresión, se decidió tomar como tiempos de tratamiento 30 minutos para cuantificar la expresión relativa de PPAR γ , PPAR α , GLUT-4 y FATP-1 (Figuras 17-20) en adipocitos 3T3-L1.

Expresión relativa de PPAR γ y GLUT-4 en adipocitos 3T3-L1

Se cuantificó la expresión de los RNAs mensajeros de PPAR γ y GLUT-4 por PCR-tiempo real. Se utilizó la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de extracto acuoso de *C. ficifolia*, con un tiempo de tratamiento de 30 minutos. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 19, en donde observamos un incremento significativo en ambos genes, con respecto al control. El incremento fue menor que el control utilizado, en este caso Pioglitazona, un agonista de PPAR γ .

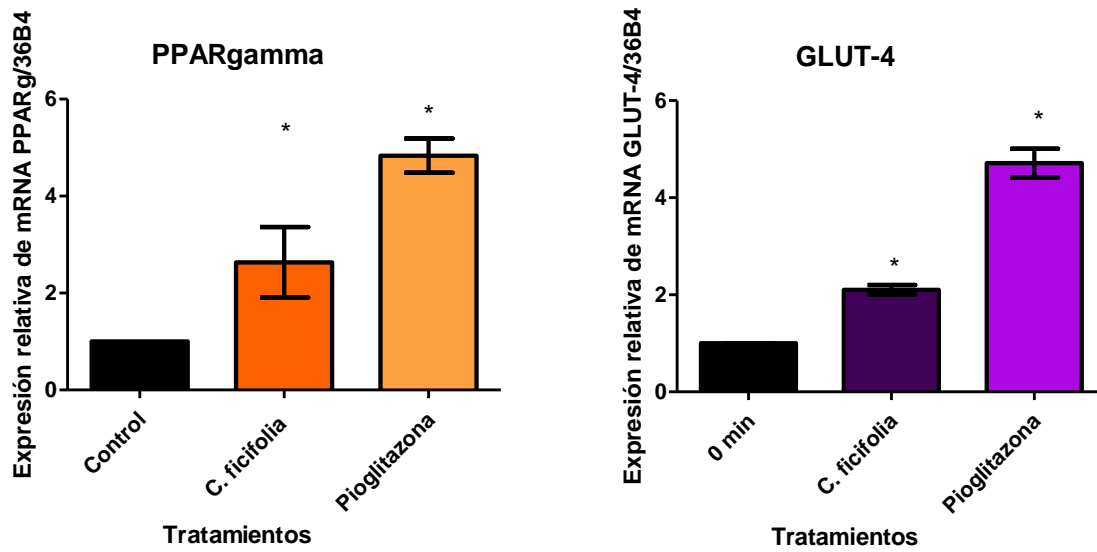


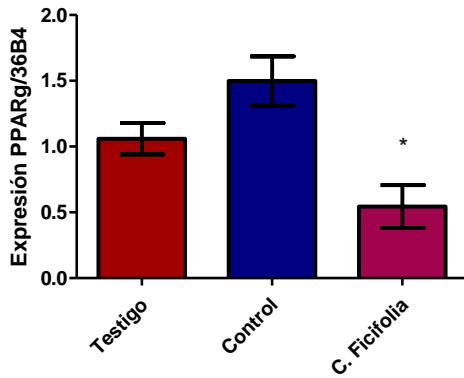
Figura 17. Expresión relativa de PPAR γ y GLUT-4 en adipocitos 3T3-L1. Grupos: No tratados, tratados a una concentración de 10 μ g de extracto acuoso de *C. ficifolia* y Pioglitazona a 5 μ g/ml por 30 minutos. . n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

Co-cultivo por intercambio de medios condicionados

Expresión de PPAR α , PPAR γ , GLUT-4, FATP-1 en adipocitos 3T3-L1 con medio condicionado de macrófagos

Uno de los métodos realizados de co-cultivo, se realizó por medio del cambio de medios de cultivo. Se trataron las líneas celulares por separado, se recolectó el medio de cultivo a las 24 horas de tratamiento. Se agregó dicho medio colectado al cultivo de la otra línea celular, a la cual no se le aplicó tratamiento. Esto se realizó para adipocitos 3T3-L1 y para macrófagos RAW 264.7., 30 minutos después de intercambiar el medio, se obtuvo el RNA total para proceder a la cuantificación de la expresión relativa de los genes descritos en la metodología (Figuras 18-20).

Expresión relativa de PPAR-gamma/36B4 en adipocitos 3T3-L1



Expresión relativa de PPAR-alfa/36B4 en adipocitos 3T3-L1

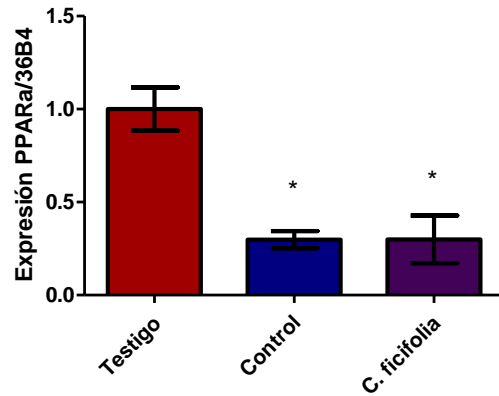


Figura 18. Expresión de PPAR γ y PPAR α en adipocitos 3T3-L1 con intercambio de medio de macrófagos tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia* por 30 minutos. . n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

El intercambio de medios de cultivo de macrófagos a adipocitos muestra solo una tendencia a aumentar la expresión de PPAR γ comparada con los adipocitos a los que no se les realizó intercambio de medio, mientras que el tratamiento de *C. ficifolia* muestra un descenso significativo de la expresión de dicho factor de transcripción (Figura 18).

La expresión de PPAR α se mantiene constante tanto en los adipocitos a los que no se les intercambié el medio con macrófagos, así como al grupo control de intercambio por medio de macrófagos no tratados, así como estimulados y con tratamiento de *C. ficifolia* (Figura 28).

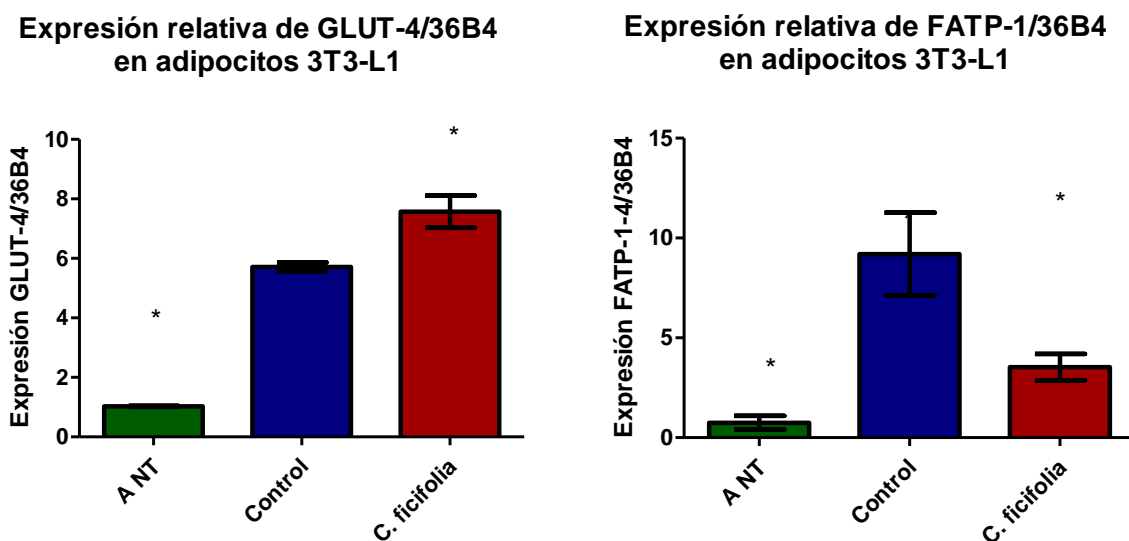


Figura 19. Expresión de GLUT-4 y FATP-1 en adipocitos 3T3-L1 con intercambio de medio de macrófagos estimulados y tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

A pesar de que el tratamiento de *C. ficifolia* no incrementó la expresión del factor de transcripción PPAR γ , uno de sus genes diana, el transportador de glucosa GLUT-4 presenta un aumento significativo tanto con el intercambio de medio de macrófagos no tratados, así como con el tratamiento. Esto podría implicar que existe una interacción entre algún intermediario producido por los macrófagos, que produce un incremento en la expresión de dicho transportador, pues el incremento se observa aun cuando los macrófagos no reciban el tratamiento de *C. ficifolia* (Figura 19).

La expresión de FATP-1 incrementa significativamente en el grupo control de adipocitos con medio intercambiado de macrófagos no tratados, comparado con el grupo de adipocitos sin intercambio de medios y disminuye significativamente su expresión para el grupo de adipocitos tratados con medio intercambiado de macrófagos estimulados y tratados con *C. ficifolia* (Figura 19). Este resultado es similar al incremento de GLUT-4, por lo tanto, se promueve un incremento en la expresión de

ambos genes que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Expresión de TNF- α , IL-6, Adiponectina, en adipocitos 3T3-L1 con medio condicionado de macrófagos

En cuanto a la expresión en adipocitos tratados con medio condicionado de macrófagos. El extracto de *C. ficifolia* incrementó tanto en la expresión de TNF- α (Figura 20), como de IL-6 (Figura 21), mientras que adiponectina se mantiene igual (Figura 22) .

Expresión relativa de TNF/36B4 en adipocitos 3T3-L1

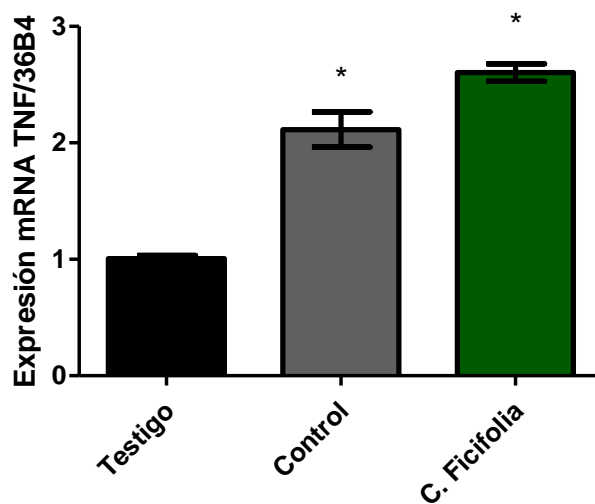


Figura 20. Expresión de TNF- α en adipocitos 3T3-L1 con intercambio de medio de macrófagos estimulados y tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

Expresión relativa de IL-6/36B4 en adipocitos 3T3-L1

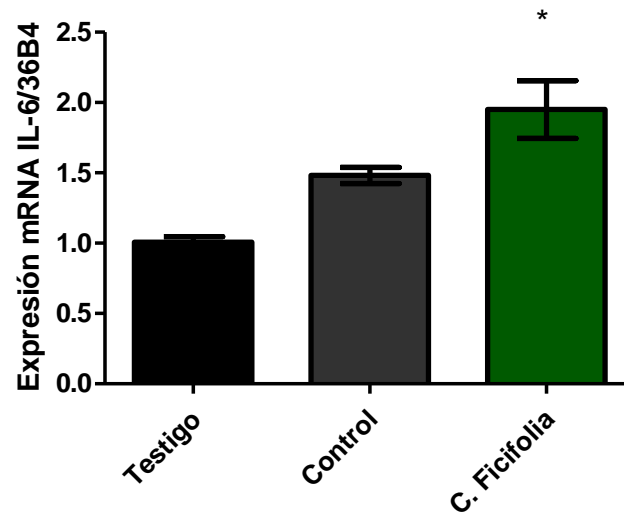


Figura 21. Expresión de IL-6 en adipocitos 3T3-L1 con intercambio de medio de macrófagos estimulados y tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* $p < 0.05$).

Expresión relativa de Adiponectina/36B4 en adipocitos 3T3-L1

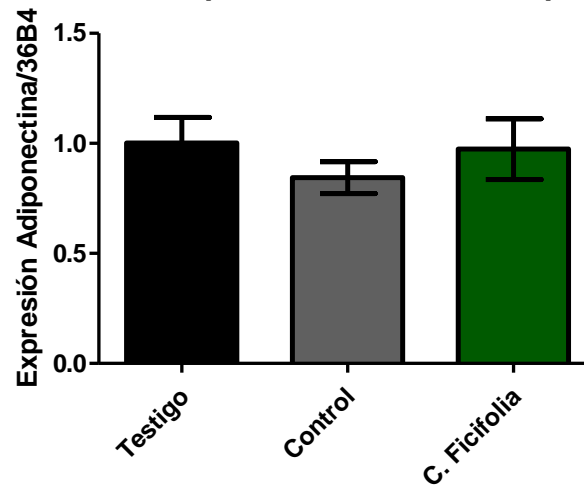


Figura 22. Expresión de Adiponectina en adipocitos 3T3-L1 con intercambio de medio de macrófagos estimulados y tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* $p < 0.05$).

Liberación de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β en macrófagos tratados con medio condicionado

Con el mismo método de co-cultivo por medios condicionados, se recuperó el medio de cultivo de los adipocitos que fueron sometidos a tratamiento de medio de macrófagos tratados con *C. ficifolia*, a las 6 horas. Se realizó una cuantificación de citocinas por método de ELISA, las figuras se muestran a continuación.

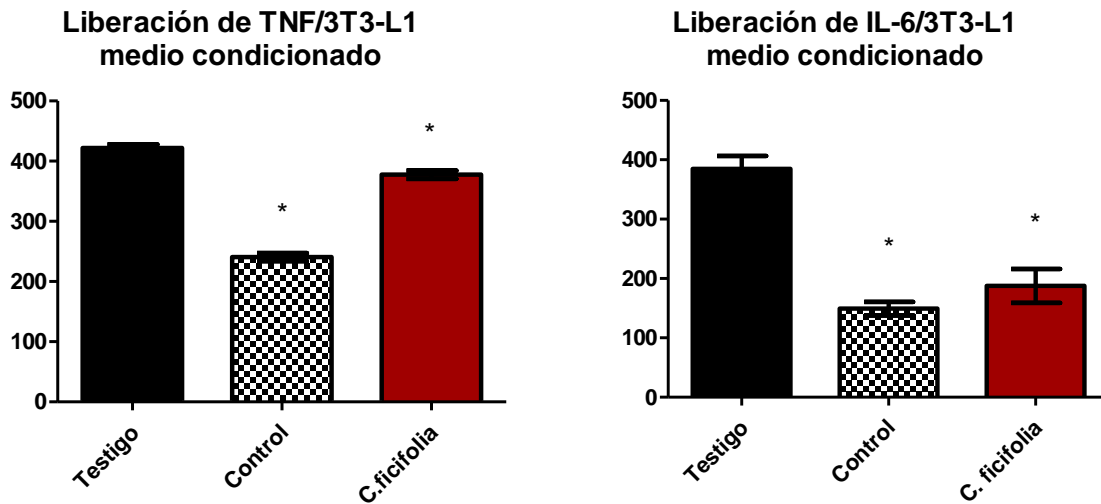


Figura 23. Liberación de TNF- α e IL-6 en adipocitos 3T3-L1 con intercambio de medio de macrófagos tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia* a 10 μ g/ml, durante 6 horas. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

La liberación tanto de TNF- α como de IL-6, disminuyen al poner en contacto nuestros adipocitos con medio de macrófagos, sin embargo, con el tratamiento de *C. ficifolia*, TNF- α incrementa (Figura 23).

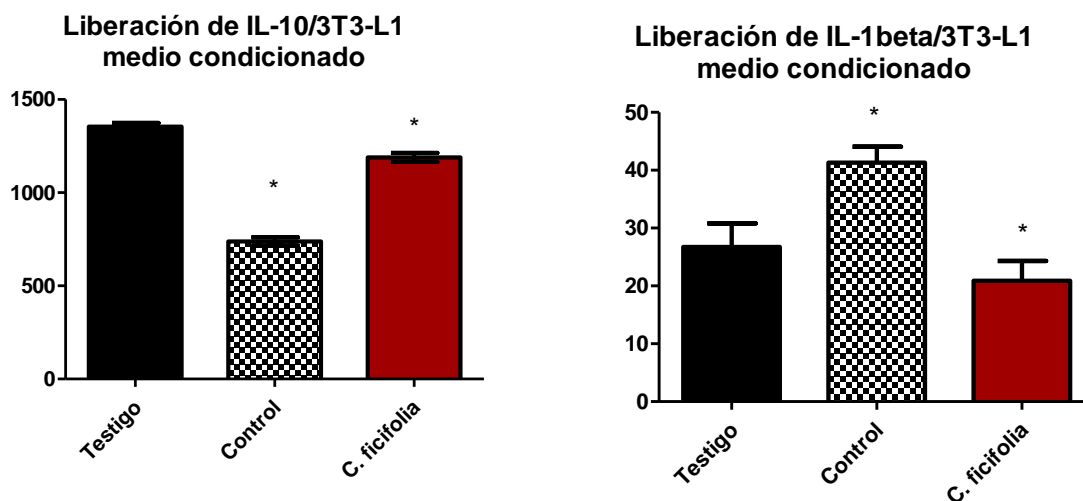


Figura 24. Liberación de IL-10 e IL-1 β en adipocitos 3T3-L1 con intercambio de medio de macrófagos tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia* a 10 μ g/ml, durante 6 horas. n=4 Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* p <0.05).

La liberación de IL-10 disminuye con la presencia del medio de macrófagos, y con el medio de macrófagos tratados con *C. ficifolia*, incrementa con respecto al control, sin llegar a los niveles de liberación de adipocitos sin ningún tratamiento (Figura 24).

Expresión de TNF- α e IL-6, IL-10, TLR-4 en Macrófagos con medio condicionado

Se estimularon macrófagos RAW 264.7 con medio de cultivo de Adipocitos 3T3-L1, tratados con extracto acuoso de *C. ficifolia*, se separaron por grupos y se midió su expresión para TNF- α e IL-6, IL-10 y TLR-4. En este caso los macrófagos no fueron estimulados con LPS, pero el medio de cultivo de los adipocitos contiene ácidos grasos liberados por las células y se ha observado que éstos estimulan los receptores TLR-4 de una manera similar al LPS.

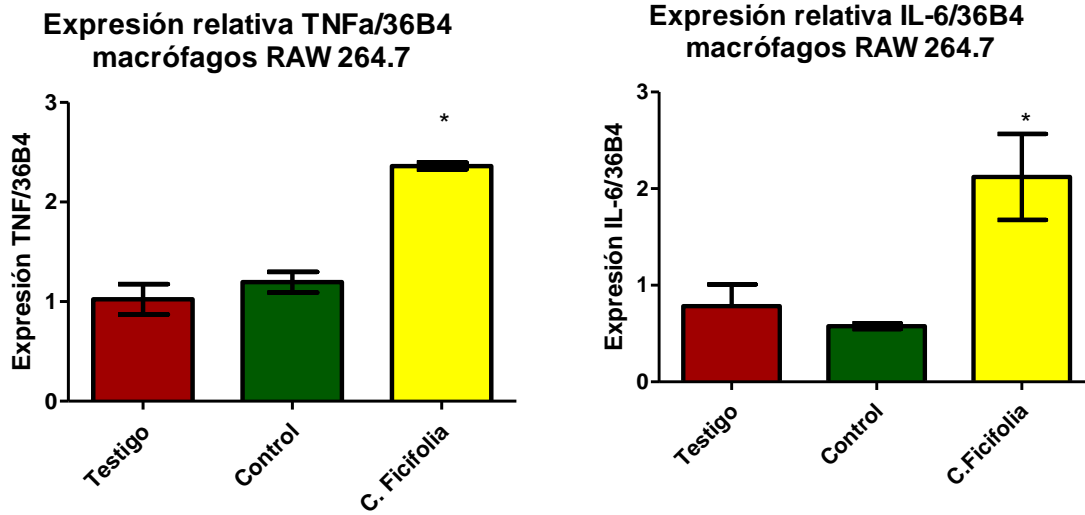


Figura 25. Expresión relativa de TNF- α e IL-6 en un sistema de cultivo de macrófagos RAW 264.7 con cambio de medio de adipocitos 3T3.L1 tratados a una concentración de 10 μ g de extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* p <0.05).

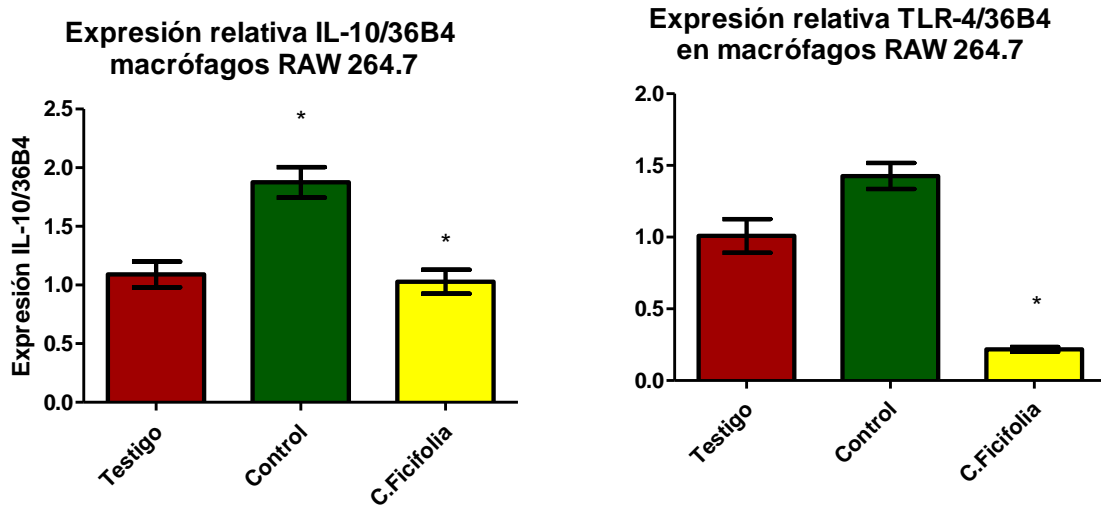


Figura 26. Expresión relativa de IL-10 y TLR4 en un sistema de cultivo de macrófagos RAW 264.7 con cambio de medio de adipocitos 3T3.L1 tratados a una concentración de 10 μ g de extracto acuoso de *C. ficifolia*, n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (* p <0.05).

Contrario a lo esperado, se observa que el grupo de macrófagos con intercambio de medio de adipocitos tratados con extracto de *C. ficifolia*, incrementa la expresión de TNF- α , mientras que el grupo de macrófagos con intercambio de medio de adipocitos sin tratamiento, solo incrementa levemente los niveles de expresión, comparado con los macrófagos solos, que es un comportamiento predecible, pues los ácidos grasos presentes en el medio de los adipocitos son un estímulo que provoca el ligero incremento en la expresión de TNF- α (Figura 25).

La expresión de IL-6 es significativamente mayor en los macrófagos que no fueron sometidos a intercambio de medios comparada con el grupo que si lo fue, aun cuando el medio de cultivo no contenía el tratamiento de *C. ficifolia*, mientras que el grupo con el tratamiento por 30 minutos muestra un incremento significativo comparado con el mismo (Figura 25).

La expresión de TLR-4 en macrófagos disminuye con el tratamiento de *C. ficifolia*, así como también disminuye para IL-10 (Figura 26).

Liberación de citocinas en macrófagos por ELISA

Para descartar estrés metabólico en las células por una concentración de nutrientes baja y esto produzca estrés metabólico, se utilizó medio condicionado de adipocitos tratados por 12 horas, y por 24 horas.

A pesar de que, a los 30 minutos de tratamiento con el medio intercambiado, los macrófagos muestran un aumento en la expresión de TNF- α , en la secreción de ésta se observa una tendencia a su disminución en los tiempos posteriores (Figura 27).

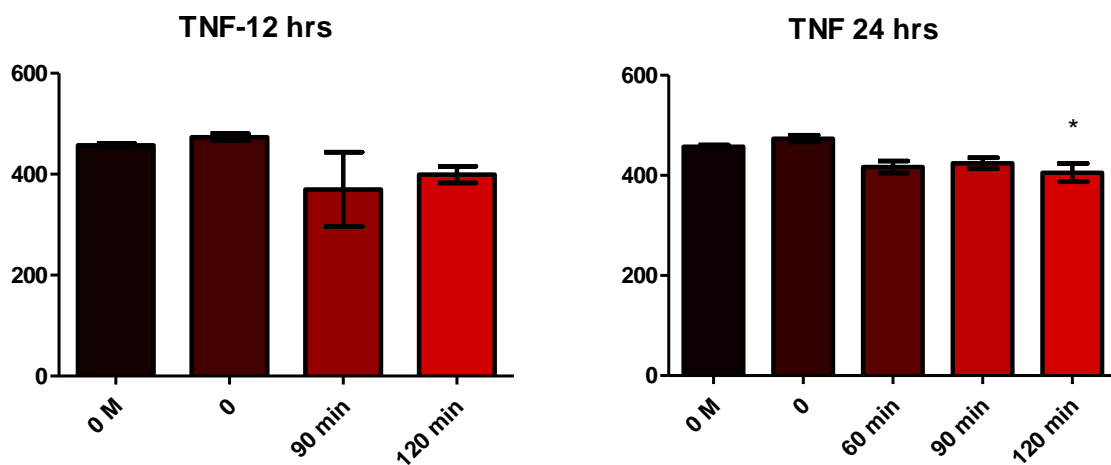


Figura 27. Secreción de TNF- α en un sistema de cultivo de macrófagos RAW 264.7 con cambio de medio de adipocitos 3T3.L1 tratados a una concentración de 10 μ g de extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

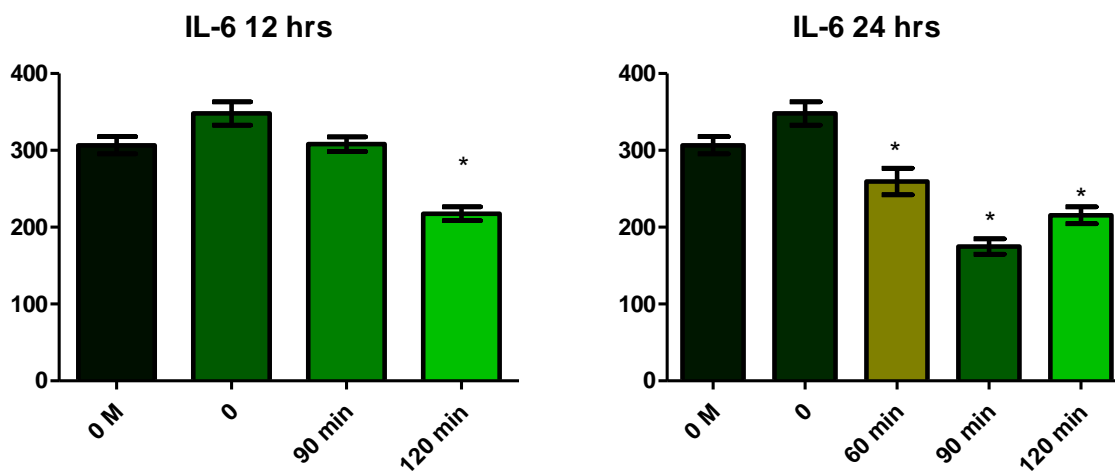


Figura 28. Secreción de IL-6 en un sistema de cultivo de macrófagos RAW 264.7 con cambio de medio de adipocitos 3T3.L1 tratados a una concentración de 10 μ g de extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

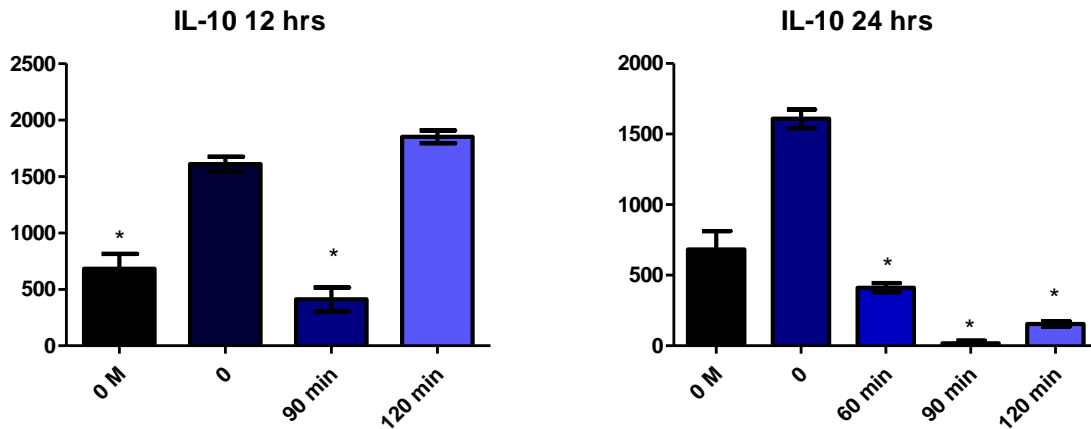


Figura 29. Secreción de IL-10 en un sistema de cultivo de macrófagos RAW 264.7 con cambio de medio de adipocitos 3T3.L1 tratados a una concentración de 10 µg de extracto acuoso de *C. ficifolia*. n=4, Media ± E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

Aunque la expresión de IL-6 aumentó a los 30 minutos de tratamiento, en el caso de la liberación de la misma, podemos observar que ésta disminuyó significativamente en todos los tiempos medidos, en el caso del tratamiento llevado a cabo por 1 ½ hora, con intercambio de medio de adipocitos tratados con *C. ficifolia* durante 24 horas, podemos observar la disminución más notoria de los niveles de IL-6 liberados por la célula (Figura 28).

Se observa un descenso en la liberación de IL-10 en todos los tiempos de tratamiento con intercambio de medio de adipocitos tratados, excepto a las 3 horas y media, en donde los niveles asemejan a los del grupo control, en el cual la liberación de IL-10 es significativamente mayor que en los macrófagos a los cuales no se les realizó el intercambio de medio (Figura 29).

Sistema de Co-cultivo simultáneo

Liberación de Citocinas en adipocitos y macrófagos sometidos a co-cultivo simultáneo

Se realizó un sistema de co-cultivo en donde ambas líneas celulares fueron sembradas simultáneamente en una placa de co-cultivo Transwell, en donde ambos tipos celulares comparten el medio de cultivo, lo que se obtuvo en cuanto a la liberación de citocinas en el medio, fue lo siguiente:

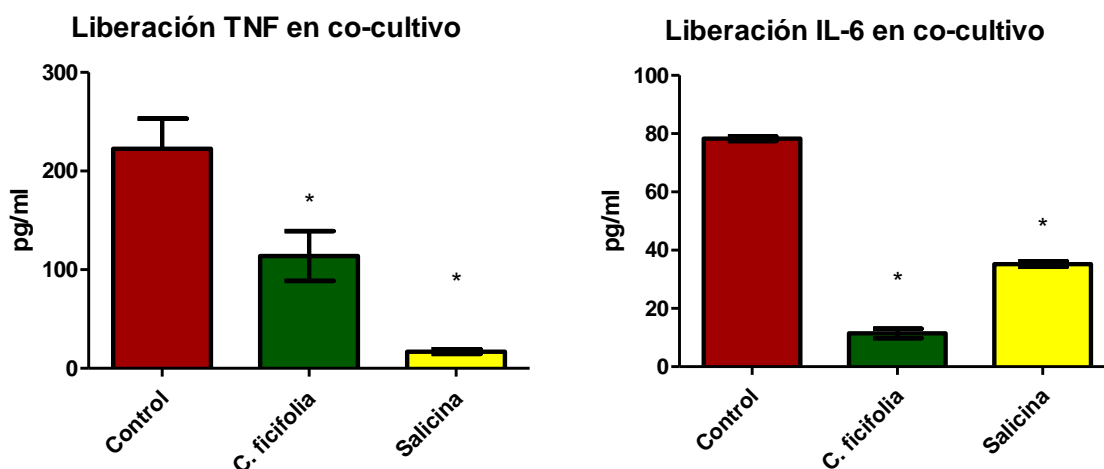


Figura 30. Liberación de TNF- α e IL-10, respectivamente, en un sistema de cultivo simultáneo de macrófagos RAW 264.7 y adipocitos 3T3-L1, tratados con *C. ficifolia* y Salicina. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

La liberación de TNF- α disminuyó significativamente con el extracto de *C. ficifolia*, mostrando en IL-6 un descenso más drástico, en ambos casos se observó un descenso en la liberación de las citocinas con salicina, siendo más notorio para TNF- α (Figura 30). En el caso de IL-1 β , no hubo diferencias significativas (Figura 31).

Liberación de IL-1beta en co-cultivo

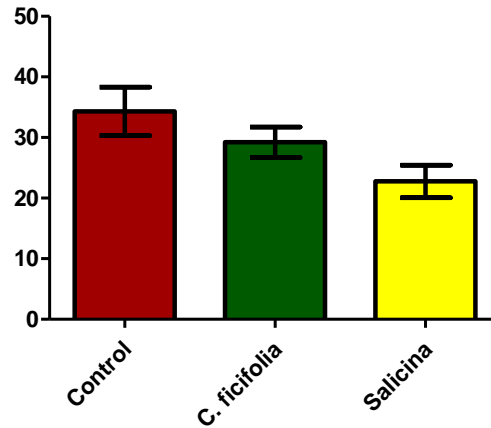


Figura 31. Liberación de TNF- α e IL-10, respectivamente, en un sistema de cultivo simultáneo de macrófagos RAW 264.7 y adipocitos 3T3-L1, tratados con *C. ficifolia* y Salicina. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

Expresión de PPAR γ en co-cultivo simultáneo de adipocitos 3T3-L1 y macrófagos RAW 264.7

En el co-cultivo simultáneo de las líneas celulares se puede apreciar un incremento significativo en la expresión del factor de transcripción PPAR γ por parte de los adipocitos, a los 30 minutos de tratamiento con el extracto de *C. ficifolia* (Figura 32).

Expresión relativa PPAR γ en co-cultivo Transwell

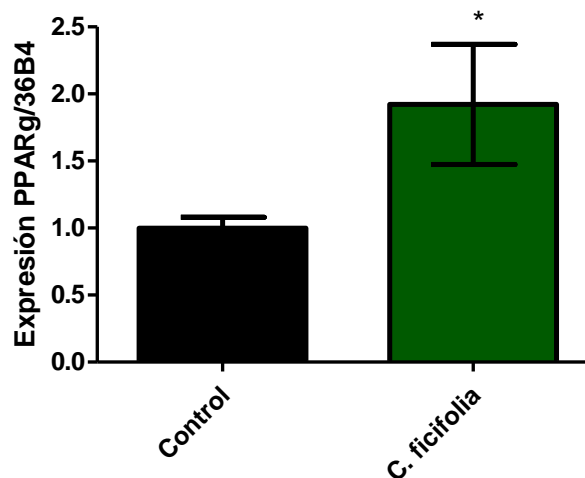


Figura 32. Expresión relativa de PPAR γ /36B4, en un sistema de cultivo simultáneo de macrófagos RAW 264.7 y adipocitos 3T3-L1, tratados con *C. ficifolia* y Salicina. n=4, Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer. Diferencias significativas comparadas con el Control (*p<0.05).

XIII. DISCUSIÓN

En estudios previos, se ha demostrado el efecto hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia*, tanto en modelos animales, como en humanos. A pesar de que se han propuesto moléculas responsables de dicha actividad, como el D-Quiroinositol (Xia and Wang 2006) no se ha comprobado plenamente su actividad hipoglucémica. Incluso, se han observado diversos efectos de *C. ficifolia*, tal es el caso de la actividad antioxidante y la reducción en la secreción de mediadores inflamatorios en adipocitos, entre otros. Y aunque se ha propuesto al D-Quiroinositol (D-QI) como el responsable de ejercer efecto hipoglucemiante, no es responsable del efecto antiinflamatorio que posee el extracto, así como de los potenciales efectos sobre los mediadores del balance energético PPARs. Por otro lado, D-QI no es uno de los componentes mayoritarios en el extracto, y a pesar de que las concentraciones de este compuesto son muy bajas, aún poseen efecto hipoglucemiante. Esto sugiere que *C. ficifolia* cuenta con otras moléculas responsables de los efectos mencionados, e incluso no se descarta la posibilidad de que contengan otros compuestos con actividad hipoglucémica. Por tal razón, se llevó a cabo un análisis fitoquímico por CLAR del extracto acuoso, con la finalidad de elegir un compuesto distinto a D-QI para estandarizar el extracto. Debido a la gran cantidad de carbohidratos que contiene el fruto, es complicado separar e identificar sus componentes de forma individual. Por ésta razón, se llevó a cabo una bipartición con Acetato de Etilo, así como extracciones con metanol, acetona y lavados del extracto acuoso con metanol, para reducir la polaridad de los componentes presentes y de este modo discriminar algunos carbohidratos que complican el análisis

de sus componentes. En los cromatogramas (Figura 2, Anexo 2) se puede apreciar que uno de los compuestos que se encuentra presente, aparentemente en gran cantidad y que es constante en los distintos extractos y fracciones (incluso en mayor concentración en la fracción de acetato de etilo), se trata de un compuesto con tiempo de retención de 8.5, por lo que consideramos que podría ser un buen candidato para estandarizar el extracto.

En estudios realizados en nuestro grupo de trabajo (García-Gonzalez, 2016), se aisló una fracción del extracto acuoso de *C. ficifolia*, que contiene el compuesto descrito anteriormente, por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se determinó que correspondía al compuesto “salicina”. En este mismo estudio, también se lograron aislar e identificar por CLAR otros 2 compuestos presentes en el extracto acuoso de *C. ficifolia*; el ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido *p*-cumárico. En el presente estudio, se estandarizó el extracto con base en su contenido de salicina.

La salicina es un glucósido alcohólico, estrechamente relacionado químicamente con el ácido acetil salicílico, conocido de forma comercial como aspirina. En la Figura 33, podemos observar su estructura química, comparada con la del ácido acetil salicílico, en donde podemos observar que la salicina tiene una glucosa en lugar del grupo acetilo que tiene el ácido acetilsalicílico, y el grupo ácido está reducido a un grupo alcohólico.



Figura 33. Estructura química del ácido acetilsalicílico y de su derivado salicílico natural, la salicina.

La salicina se ha encontrado presente en la corteza del sauce y entre los efectos que se le atribuyen se encuentran analgésico, anticoagulante, antipirético y antiinflamatorio por su acción inhibitoria en COX 1 y 2, alterando con ello la en síntesis de prostaglandinas, moléculas que regulan funciones fisiológicas como la presión sanguínea, coagulación, respuesta inflamatoria y actividad del aparato digestivo (Kong, Kim et al. 2014).

En el presente estudio se observó que la concentración de salicina presente en el extracto acuoso de *C. ficifolia*, es de 877 μg por cada gramo de extracto, dada la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que se dio como tratamiento, tendríamos un equivalente en molaridad de 30.63 μM .

Entre los resultados encontramos que, si bien el extracto acuoso de *C. ficifolia* no generó un aumento significativo en la expresión de PPAR γ en uno de los sistemas de co-cultivo, el cual corresponde a adipocitos a los que se les intercambió el medio de cultivo por el de macrófagos tratados con *C. ficifolia*, si produjo un incremento significativo en la expresión de GLUT-4, el transportador de glucosa que se encuentra presente en mayor cantidad en tejido adiposo. Esta actividad biológica se ha sugerido

como uno de los mecanismos por los cuales *C. ficifolia* ejerce su efecto hipoglucémico, puesto que una de las estrategias fisiológicas para disminuir la glucemia, es la incorporación de glucosa a los tejidos periféricos, entre ellos el tejido adiposo. Esto es facilitado por medio de la señalización de la insulina, la cual es secretada por las células beta-pancreáticas y pasa al torrente sanguíneo, distribuyéndose en todo el organismo y llegando a células sensibles a la acción de ésta hormona, ya que poseen receptores en su porción extracelular. Los receptores se encuentran acoplados a enzimas con actividad de tirosín-cinasa, desencadenando así cascadas de señalización. Las vías de señalización que son activadas por la activación del receptor de insulina son dos; vía del fosfatidilinositol-3-cinasa o PI3K, asociada al metabolismo de la glucosa y de lípidos; y vía de las cinasas activadas por mitógenos o MAPK, relacionada con la regulación de síntesis protéica (Rosengren, Braun et al. 2012).

La vía PI3K es el mecanismo más importante por el que la insulina ejerce sus funciones metabólicas. En tejido adiposo y muscular, la insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 desde los compartimentos intracelulares, a la membrana plasmática, lo cual permite el ingreso de la glucosa circulante en sangre, al interior del adipocito (Hotamisligil 2003).

Cuando las necesidades energéticas de la célula están cubiertas y la concentración de sustratos oxidables es elevada, se favorece la síntesis de ácidos grasos en hepatocitos, mientras que solo una mínima parte de esto se realiza en los propios adipocitos. Los ácidos grasos sintetizados por el hígado son transportados a las células del tejido adiposo por diversas vías. En primera instancia se unen a la proteína

albúmina, para su distribución a los diversos tejidos. La incorporación de ácidos grasos involucra proteínas de membrana con alta afinidad por ácidos grasos. Existen distintos miembros de la familia de receptores de ácidos grasos, como la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36), proteína de unión a ácidos grasos (FABP) y proteínas de transporte de ácidos grasos (FATP). Los FATP facilitan la adopción de ácidos grasos de cadena larga (Larque, 2006).

En adipocitos la isoforma FATP-1 es el tipo de proteína transportadora más abundante, está encargada del tráfico de ácidos grasos destinados a almacenaje en el adipocito, vía acilación vectorial. Una cuestión fundamental en la acilación vectorial, es que los ácidos grasos se activan después del transporte, haciendo este proceso unidireccional (Sandoval, Fraisl et al. 2008).

La afinidad de los ácidos grasos por el FATP-1, se incrementa conforme se aumenta la longitud de cadena. El FATP-1 es de gran importancia en la toma, almacenamiento y probablemente liberación de ácidos grasos en tejido adiposo (Lobo, Wiczner et al. 2007).

Bajo este tipo de sistema de co-cultivo por intercambio de medios, se observó que al someter a los adipocitos al medio de macrófagos (también llamado grupo control), tanto PPAR γ como GLUT-4 incrementan sus niveles de expresión. Sin embargo, cuando el medio intercambiado fue de macrófagos tratados con *C. ficifolia* a adipocitos, la dinámica de expresión de estos genes cambia, disminuyendo PPAR γ y aumentando la expresión de GLUT-4, este cambio fue de mayor intensidad cuando el medio de cultivo provenía de grupos controles. Esto nos brinda información importante sobre la

dinámica y comunicación entre los dos tipos celulares y reafirma el hecho de que el tratamiento con *C. ficifolia* incrementa la expresión de GLUT-4, independientemente de que aumente la expresión de PPAR γ , posiblemente por su activación.

Como se mencionó anteriormente, la actividad de FATP1 está ligada al estado energético de un organismo, una regulación negativa de FATP-1 podría ser benéfica y resultar en un menor almacenamiento de grasa, sin embargo, los ácidos grasos que no ingresan al adipocito, permanecen en la circulación y si no son oxidados, pueden depositarse en otros tejidos. ésta disminución la pudimos observar en los adipocitos a los cuales se les intercambié medio de cultivo de macrófagos que fueron tratados con *C. ficifolia*, pudimos observar una disminución en la expresión de FATP-1, comparado contra nuestro control de adipocitos a los cuales solo se les intercambié medio de macrófagos no tratados, esto se puede co-relacionar al descenso que se dio con el mismo tratamiento en la expresión de su factor de transcripción PPAR α .

En cuanto a la liberación de citocinas en macrófagos con medio condicionado de adipocitos, TNF- α , IL-6 e IL-10, disminuyen su liberación en el grupo Control (sometido únicamente a intercambio de medio de adipocitos), a la vez que IL-1 β incrementa. En el caso contrario, cuando a los adipocitos los sometimos a medio de cultivo de macrófagos tratados con *C. ficifolia*, de manera opuesta, TNF- α , IL-6 e IL-10 incrementan, mientras que IL-1 β disminuye.

Esto nos sugiere que los compuestos presentes en *C. ficifolia* pueden ejercer distintas acciones en los dos tipos celulares, lo cual discutiremos más adelante.

Puesto que el macrófago es un tipo celular estrechamente involucrado en las patologías asociadas a obesidad/diabetes, resulta importante saber cómo afecta la interacción con los adipocitos. Observamos en la Figura 16, que el tratamiento con extracto acuoso de *C. ficifolia* tiene un efecto inhibitorio en la liberación de TNF- α , sin embargo, para saber qué efectos podría tener la liberación de factores producidos por el adipocito, intercambiamos el medio a macrófagos, por medio de adipocitos sin tratamiento y con tratamiento de *C. ficifolia*. Al momento de someter los macrófagos a medio condicionado de adipocitos, observamos que tiene un impacto principalmente sobre la expresión de IL-10 y TLR-4, incrementando sus niveles de expresión. Esto puede deberse a que el adipocito libera ácidos grasos al medio de cultivo, mismos que al estar en contacto con los macrófagos, pueden unirse a los receptores TLR-4, y con ello generar un incremento en su expresión.

Uno de los eventos que ocurren al activar la señalización de TLR-4, es la expresión de citocinas. Se logró observar un incremento en la liberación de IL-6, citocina que es producida principalmente por el macrófago. En el caso de IL-10, incrementa con el medio condicionado de adipocitos sin tratamiento, tanto en expresión, como en liberación, esto corresponde a que IL-10 es una citocina antiinflamatoria, en donde una de sus funciones es limitar la respuesta inflamatoria de células inmunes, como en este caso, el macrófago, inhibiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β . Su efecto inhibitorio no se observa claramente en la liberación de dichas citocinas, sin embargo, TNF- α no incrementó, y las concentraciones de IL-1 β fueron muy bajas.

En esta misma línea celular, con medio condicionado de adipocitos tratados con *C. ficifolia*, se observa algo distinto al grupo control. Se logró apreciar un descenso significativo en liberación de TNF- α , IL-6 e IL-10.

Uno de los múltiples efectos de TNF- α en el tejido adiposo, es incrementar la expresión de factores de adhesión, aumentando así la adherencia de células del sistema inmune, entre ellas macrófagos. La infiltración de nuevos macrófagos estaría contribuyendo a exacerbar el ambiente pro-inflamatorio, a la vez que, junto con IL-1 β , se inicia la segunda fase de liberación de citocinas como IL-6, que inducen la producción de proteínas de fase aguda en tejido hepático. Con el descenso en estas citocinas pro-inflamatorias se logra una mejora en el estado inflamatorio del tejido adiposo.

Para comparar el co-cultivo por intercambio de medios con un co-cultivo en donde la interacción entre los tipos celulares por sus respectivos factores secretados sea de manera simultánea, se llevó a cabo un co-cultivo en placas Transwell. En este sistema, la liberación de TNF- α e IL-6, disminuye significativamente, IL-10 no se detectó, e IL-1 β se mantuvo. Únicamente se cuantificó su expresión relativa para PPAR γ , en donde hubo un incremento.

Tabla 5. Citocinas liberadas por cambio de medios de cultivo.

Citocina	Adipocito/ medio condicionado (Control)	Adipocito/ medio condicionado (<i>C.ficifolia</i>)	Macrófago/ medio condicionado (Control)	Macrófago/ medio condicionado (<i>C.ficifolia</i>)	Co-cultivo Transwell (<i>C. ficifolia</i>)
TNF- α	↓	↑	≈	↓	↓
IL-6	↓	↑	↑	↓	↓
IL-10	↓	↑	↑	↓	0
IL-1 β	↑	↓	0	0	≈

Tabla 6 . Expresión de PPAR γ , GLUT-4, PPAR α , FATP-1, Adiponectina en Adipocitos con cambio de medios de cultivo.

ADIPOCITOS 3T3-L1 / Medio condicionado de macrófago RAW 264.7		
	Control	<i>C. ficifolia</i>
PPAR γ	↑	↓
GLUT-4	↑	↑
PPAR α	↓	≈
FATP-1	↑	↓
Adiponectina	≈	≈

Tabla 7. Expresión de citocinas y TLR-4 en macrófagos por cambio de medios de cultivo.

MACRÓFAGOS RAW 264.7 / medio condicionado de adipocitos 3T3-L1		
	Control	<i>C. ficifolia</i>
TNF- α	≈	↑
IL-6	↓	↑
IL-10	↑	↓
TLR-4	↑	↓

Podemos observar que cuando sometemos a los adipocitos a medio de cultivo condicionado por macrófagos tratados con *C. ficifolia*, todas las citocinas incrementan su liberación, excepto IL-1 β . Por el contrario, al someter los macrófagos al medio de adipocitos tratados con *C. ficifolia*, las citocinas disminuyen su liberación. Así mismo, en el co-cultivo simultáneo de ambas líneas celulares, se observa una disminución en la liberación de todas las citocinas. Esto nos sugiere que el extracto acuoso de *C.*

ficifolia, promueve un cambio en los adipocitos, posiblemente a través de la activación de PPAR γ . Únicamente pudimos observar un incremento en la expresión de PPAR γ en el adipocito aislado y sometido a tratamiento con *C. ficifolia* y en el co-cultivo simultáneo en placas transwell. En el caso de adipocitos con medio condicionado de macrófagos tratados con *C. ficifolia* no se observa dicho aumento en la expresión de PPAR γ , sin embargo, si se observa un incremento en la expresión de GLUT-4, uno de sus genes diana más importantes para la adipogénesis y para disminuir la glucemia por medio del ingreso de glucosa al adipocito. Esto posiblemente esté dado por la activación de PPAR γ , un factor de transcripción que promueve la síntesis de transportadores de glucosa, y que posiblemente también podría ser responsable de la inhibición en la liberación de citocinas. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que la dinámica entre macrófagos tratados con medio de adipocitos, no muestra una mejora en los mediadores inflamatorios. Esto puede estar dado por que la activación del factor de transcripción NF κ B, generada por la estimulación de los receptores TLR-4, mediante ácidos grasos, inhibe la actividad de PPAR γ , impidiendo una mejora en el metabolismo de glucosa y lípidos, e impidiendo una modulación del estado infamatorio, puesto que la activación de PPAR γ , reprime la actividad de NF κ B de manera recíproca, limitando la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Por otro lado, se logró observar que la salicina (uno de los compuestos encontrados en el extracto de *C. ficifolia*), disminuye la liberación de citocinas como TNF- α e IL-1 β , comportamiento esperado, puesto que es un compuesto reportado como agente antiinflamatorio.

Con respecto al co-cultivo mediante dispositivo transwell, modelo que imita la interacción entre adipocitos y macrófagos, simulando un tejido adiposo remodelado, como ocurre en la obesidad, parece ser favorable el co-cultivo simultáneo de ambas líneas celulares, pues la dinámica celular se puede dar “en tiempo real”, sin que los tiempos en los que se toman mediciones sean un factor más que interviene en el análisis de los resultados.

Posiblemente el extracto acuoso de *C. ficifolia* tenga sus efectos por medio, ya sea de una sinergia entre distintos compuestos, o por la acción de sus distintos compuestos, por diversas vías. En este sentido, sería de gran importancia realizar un estudio fitoquímico más extenso, en donde, por medio de estudios biodirigidos, se puedan separar e identificar los distintos compuestos posiblemente responsables de algunos de sus efectos.

XIV. CONCLUSIONES

- El tratamiento con medio de cultivo de adipocitos tratados con *C. ficifolia*, promueve una disminución en la liberación de TNF- α , IL-6, IL-10 en macrófagos.
- En un sistema de co-cultivo simultáneo, el tratamiento con *C. ficifolia* también disminuye la liberación de TNF- α e IL-6 en macrófagos, y promueve un incremento en la expresión de PPAR γ en adipocitos.
- El tratamiento con medio de cultivo de macrófagos tratados con *C. ficifolia*, produce un incremento en la expresión de GLUT-4 y una disminución en FATP-1 en adipocitos.
- *C. ficifolia* tiene la capacidad de ejercer efecto sobre marcadores inflamatorios y energéticos. Sin embargo, en un sistema de co-cultivo, el efecto de *C. ficifolia* sobre dichos marcadores permite suponer una mejoría general del estado inflamatorio y metabólico, en un tejido adiposo infiltrado por macrófagos.
- Los resultados de esta investigación ponen de manifiesto que la interacción de adipocitos y macrófagos tiene repercusión en el estado energético e inflamatorio del tejido adiposo.

XV. PERSPECTIVAS

Puesto que el extracto acuoso de *C. ficifolia*, cuenta con una diversa gama de compuestos, de entre los que se aisló la salicina, resultaría importante separar e identificar los compuestos mayoritarios, para evaluarlos sobre el sistema inflamatorio y metabólico, así como distintas combinaciones de éstos, con motivo de describir las posibles sinergias que podrían presentarse.

XVI. REFERENCIAS

- Acosta-Patino, J. L., E. Jimenez-Balderas, M. A. Juarez-Oropeza and J. C. Diaz-Zagoya (2001). "Hypoglycemic action of Cucurbita ficifolia on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels." J Ethnopharmacol **77**(1): 99-101.
- Agarwal, S., A. Yadav and R. K. Chaturvedi (2016). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as therapeutic target in neurodegenerative disorders." Biochem Biophys Res Commun.
- Alarcon-Aguilar, F. J., E. Hernandez-Galicia, A. E. Campos-Sepulveda, S. Xolalpa-Molina, J. F. Rivas-Vilchis, L. I. Vazquez-Carrillo and R. Roman-Ramos (2002). "Evaluation of the hypoglycemic effect of Cucurbita ficifolia Bouche (Cucurbitaceae) in different experimental models." J Ethnopharmacol **82**(2-3): 185-189.
- American Diabetes, A. (2014). "Standards of medical care in diabetes--2014." Diabetes Care **37 Suppl 1**: S14-80.
- Bahreini, N., M. I. Noor, P. B. Koon, R. A. Talib, S. H. Lubis, M. G. Dashti, A. Salehi-Abargouei and A. Esmailzadeh (2013). "Weight status among Iranian adolescents: Comparison of four different criteria." J Res Med Sci **18**(8): 641-646.
- Brahma PK, Z. H., Murray BS, Shu FJ, Sidell N, Seli E, Kallen CB (2012). "The mRA-binding protein Zfp36 is upregulated by β -adrenergic stimulation and represses IL-6 production in 3T3-L1 adipocytes." Obesity **1**(40).
- Carvajal, K., L. Hernandez-Esquivel Mde and R. Moreno-Sanchez (2007). "[PPARs, metabolic syndrome and cardiac diseases]." Arch Cardiol Mex **77 Suppl 4**: S4-66-76.
- Choe, S. S., J. Y. Huh, I. J. Hwang, J. I. Kim and J. B. Kim (2016). "Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders." Front Endocrinol (Lausanne) **7**: 30.
- Fausto, S.-M. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. Gaceta Médica de México. **141**.
- García-González, J. (2011). "Proliferación de células β pancreáticas en ratones diabéticos tratados con Cucurbita ficifolia Bouché." Tesis para obtener el grado de maestría.

- Glass, C. K. and S. Ogawa (2006). "Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(1): 44-55.
- Gregor, M. F. and G. S. Hotamisligil (2011). "Inflammatory mechanisms in obesity." Annu Rev Immunol **29**: 415-445.
- Hotamisligil, G. S. (2003). "Inflammatory pathways and insulin action." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S53-55.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**(7121): 860-867.
- Hotamisligil, G. S. and E. Erbay (2008). "Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases." Nat Rev Immunol **8**(12): 923-934.
- Itoh, M., T. Suganami, R. Hachiya and Y. Ogawa (2011). "Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation." Int J Inflamm **2011**: 720926.
- Kong, C. S., K. H. Kim, J. S. Choi, J. E. Kim, C. Park and J. W. Jeong (2014). "Salicin, an extract from white willow bark, inhibits angiogenesis by blocking the ROS-ERK pathways." Phytother Res **28**(8): 1246-1251.
- Kuryszko, J., P. Slawuta and G. Sapikowski (2016). "Secretory function of adipose tissue." Pol J Vet Sci **19**(2): 441-446.
- Lobo, S., B. M. Wiczer, A. J. Smith, A. M. Hall and D. A. Bernlohr (2007). "Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4." J Lipid Res **48**(3): 609-620.
- Lumeng CN, D. S., Saltiel AR (2007). "Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins." American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism **292**(2921): 166-174.
- Mancuso, P. (2016). "The role of adipokines in chronic inflammation." Immunotargets Ther **5**: 47-56.
- Miranda-Perez, M. E., C. Ortega-Camarillo, M. Del Carmen Escobar-Villanueva, G. Blancas-Flores and F. J. Alarcon-Aguilar (2016). "Cucurbita ficifolia Bouche increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum." J Ethnopharmacol **188**: 159-166.

- Olokoba, A. B., O. A. Obateru and L. B. Olokoba (2012). "Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends." Oman Med J **27**(4): 269-273.
- Perseghin, G., G. Lattuada, M. Danna, L. P. Sereni, P. Maffi, F. De Cobelli, A. Battezzati, A. Secchi, A. Del Maschio and L. Luzi (2003). "Insulin resistance, intramyocellular lipid content, and plasma adiponectin in patients with type 1 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(6): E1174-1181.
- Perseghin, G., K. Petersen and G. I. Shulman (2003). "Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S6-11.
- Rodríguez Bolaños RA, R. S. L., Jiménez Ruíz JA, Juárez Márquez SA, Hernández Ávila M. (2010). "Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de microcosteo." Rev Panam Salud Publica **28**(6): 412-420.
- Rosengren, A. H., M. Braun, T. Mahdi, S. A. Andersson, M. E. Travers, M. Shigeto, E. Zhang, P. Almgren, C. Ladenvall, A. S. Axelsson, A. Edlund, M. G. Pedersen, A. Jonsson, R. Ramracheya, Y. Tang, J. N. Walker, A. Barrett, P. R. Johnson, V. Lyssenko, M. I. McCarthy, L. Groop, A. Salehi, A. L. Gloyn, E. Renstrom, P. Rorsman and L. Eliasson (2012). "Reduced insulin exocytosis in human pancreatic beta-cells with gene variants linked to type 2 diabetes." Diabetes **61**(7): 1726-1733.
- Sandoval, A., P. Fraisl, E. Arias-Barrau, C. C. Dirusso, D. Singer, W. Sealls and P. N. Black (2008). "Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking." Arch Biochem Biophys **477**(2): 363-371.
- Takada, I., A. P. Kouzmenko and S. Kato (2009). "Wnt and PPAR gamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis." Nature Reviews Rheumatology **5**(8): 442-447.
- Velloso, L. A., F. Folli and M. J. Saad (2015). "TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation." Endocr Rev: er20141100.
- Wang Z, L. Q., Li P, Zou C, Shen Z (2008). "Effect of GCP-02, a PPARalpha/gamma dual activator, on glucose and lipid metabolism in insulin-resistant mice. ." European Journal of Pharmacology **580**: 277-283.
- Xia, T. and Q. Wang (2006). "Antihyperglycemic effect of Cucurbita ficifolia fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats." Fitoterapia **77**(7-8): 530-533.

- Xia, T. and Q. Wang (2006). "D-chiro-inositol found in Cucurbita ficifolia (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats." J Pharm Pharmacol **58**(11): 1527-1532.
- Yazdi, F. T., S. M. Clee and D. Meyre (2015). "Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again." PeerJ **3**: e856.
- Zhang, X. and D. M. Mosser (2008). "Macrophage activation by endogenous danger signals." J Pathol **214**(2): 161-178.

XVII. ANEXOS

ANEXO 1

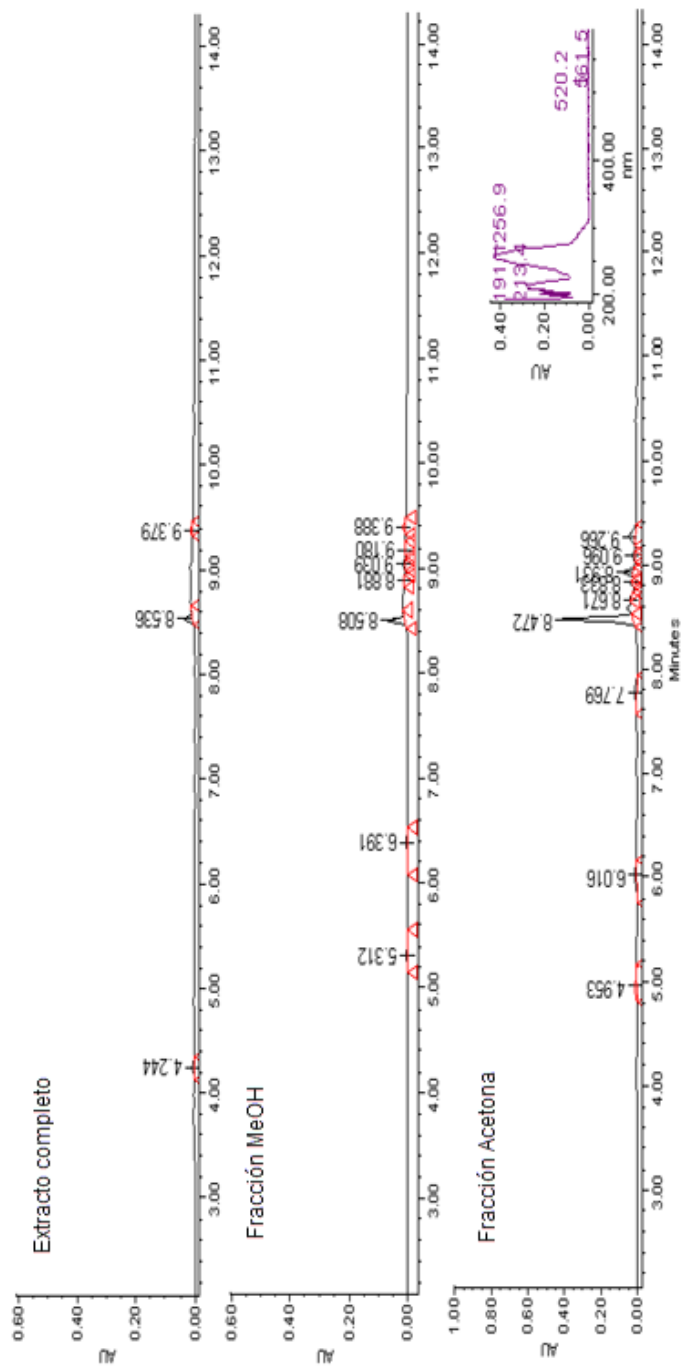


Figura 1. Cromatogramas del extracto acuoso completo. Comparación de un Extracto completo de Cucurbita ficifolia y su Fracción metanólica, Fracción Acetónica, Fracción C5F8 que contiene salicina.

ANEXO 2

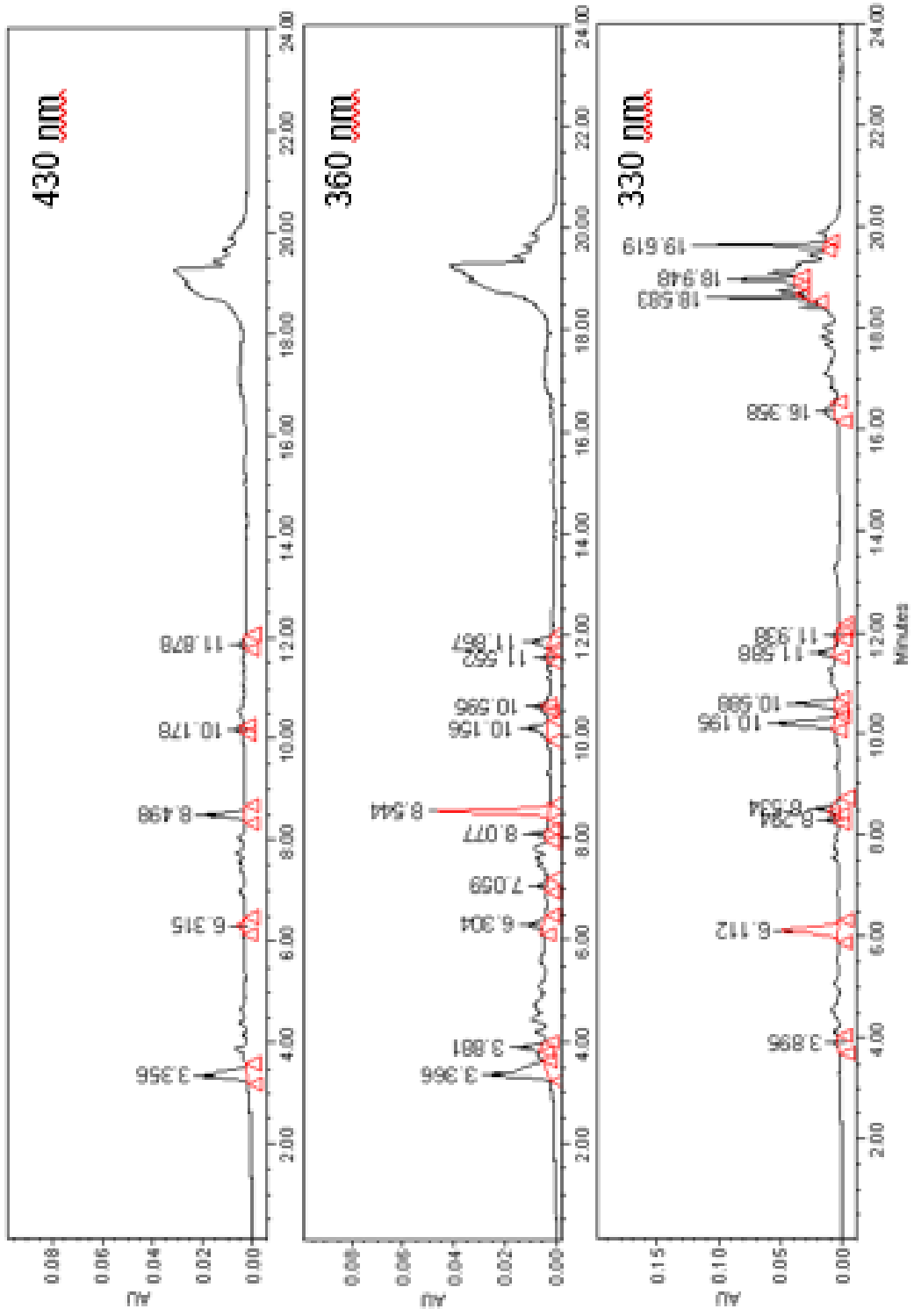


Figura 2. Cromatograma del extracto acuoso a 430, 360 y 330 nanómetros.