

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



Casa abierta al tiempo

**EFFECTO DE UN EXTRACTO HIPOGLUCEMIANTE DE *Cucurbita ficifolia* Bouché
SOBRE LOS NIVELES DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN RATONES
OBESOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. FORTIS BARRERA MARÍA DE LOS ÁNGELES.

COMITÉ TUTORAL

Directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Dra. Rebeca García Macedo.

Asesor:

Dr. Miguel Cruz López

México D.F.

Diciembre, 2009

Comité tutorial

Co-Director: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Profesor titular C

Dpto. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

aaaf@xanum.uam.mx

Co-Directora: Dra. Rebeca García Macedo.

Investigadora asociado C

Investigadora de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS

gamareb@yahoo.es

Asesor: Dr. Miguel Cruz López.

Investigador titular B

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades CMN SXXI. IMSS

mcruzl@yahoo.com

“El programa de la maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 309-1) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT PIFOP-CONACyT-SEP y cuenta con apoyo del mismo consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32”.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa y en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. La alumna Fortis Barrera María de los Ángeles recibió apoyo de CONACYT, con el número de registro (CVU/becario) 239767/212872.

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Efecto de un extracto hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia* Bouché sobre los niveles de citocinas proinflamatorias en ratones obesos. Con fecha 08 de Diciembre de 2009.”

Dr. Rubén Román Ramos.

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

(Presidente)



Dr. Miguel Cruz López.

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

(Secretario)



Dra. Margarita Díaz Flores.

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

(Vocal)



Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.

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

(Vocal)



Dedicatorias y Agradecimientos

A mis padres y hermanos. Por su cariño y paciencia en el transcurso de mi vida, motivos por los cuales he realizado mis metas.

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

A mis amigos y compañeros de laboratorio de farmacología. Por compartir sus conocimientos y su ayuda en el trabajo experimental. Julio, Gerardo, Selene, Gabriela, Tania, Ivan, Jesica.

A mis amigos y compañeros de laboratorio de Bioquímica. Por hacer agradable mi estancia en centro médico. Selene, Gerardo, Fernanda, Hilda, Sonia, Jhony, Javier.

Al Dr. Rubén y al Dr. José Luis del laboratorio de Farmacología. Por su amistad y compartir sus conocimientos.

A la Dr. Margarita del laboratorio de Bioquímica. Por su amistad y su ayuda en mi formación científica.

A CONACYT. Por apoyarme económicamente durante la maestría. El número de registro (CVU/becario) 239767/212872.

ÍNDICE

Resumen. -----	1
Abstract. -----	3
1. Introducción. -----	5
1.1 Diabetes mellitus y obesidad. -----	5
1.2 Desarrollo de la diabetes mellitus en la obesidad. -----	6
1.3 Participación del tejido adiposo en la inflamación. -----	7
1.3.1 Factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α). -----	7
1.3.2 Interleucina 6 (IL-6). -----	8
1.3.3 Resistina. -----	9
1.3.4 Interleucina 10 (IL-10). -----	10
1.3.5 Adiponectina. -----	12
2. Antecedentes. -----	13
2.1 <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché: una planta utilizada para el control de la diabetes mellitus. -----	13
3. Justificación. -----	16
4. Hipótesis. -----	16
5. Objetivos. -----	17
5.1 Objetivo general. -----	17
5.2 Objetivos particulares. -----	17
6. Material y método. -----	18
6.1 Preparación del extracto acuoso de <i>Cucurbita ficifolia</i> . -----	18
6.2 Inducción de obesidad en ratones. -----	18
6.3 Determinación del peso corporal y parámetros bioquímicos. -----	20
6.4 Evaluación de resistencia a la insulina. -----	21

6.5 Cuantificación de las concentraciones plasmáticas de citocinas. -----	21
6.6 Cuantificación de la expresión de citocinas por RT-PCR en tiempo real. -----	22
6.6.1 Extracción del RNAm. -----	22
6.6.2. Transcripción en reversa (RT). -----	23
6.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa en “tiempo real” (PCR). -----	24
7. Análisis estadístico. -----	26
8. Resultados. -----	26
8.1 Efecto hipoglucemico de <i>C. ficifolia</i> en ratones sanos. -----	26
8.2 Efecto del extracto acuoso de <i>C. ficifolia</i> sobre el peso corporal y la ingesta de alimento en ratones sanos y obesos.-----	27
8.3 Efecto del extracto de <i>C. ficifolia</i> sobre parámetros bioquímicos y evaluación de resistencia a la insulina en los ratones sanos y obesos. -----	29
8.4 Expresión de citocinas después del tratamiento con extracto de <i>C. ficifolia</i> en ratones sanos y obesos. -----	32
9. Discusión. -----	40
10. Conclusión. -----	47
11. Bibliografía. -----	48

Resumen

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa nociva para la salud. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el 2005 había en el mundo aproximadamente 1600 millones de adultos con sobrepeso y 400 millones de adultos obesos y se calcula que en el 2015 habrá aproximadamente 2300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad. Diversos estudios han relacionado a la obesidad como factor importante para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DT2).

En la obesidad y en la DT2 se presenta una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado. El exceso de tejido adiposo blanco tiene una función importante en este proceso, al incrementar la producción anormal de citocinas, como el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), resistina, adiponectina, entre otras., las cuales se han relacionado con la resistencia a la insulina.

La importancia de la inflamación en el desarrollo de estas patologías ha llevado a proponer nuevas alternativas farmacológicas, dirigidas al tratamiento de este proceso. En México, una planta que se utiliza empíricamente en el control de la DT2 es *Cucurbita ficifolia* (*C. ficifolia*). Se ha demostrado que el extracto acuoso del fruto de *C. ficifolia* disminuye los niveles séricos de TNF- α e incrementa interferón gama (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10) en ratones diabéticos. Sin embargo, aún se desconocen otros efectos que podría tener el extracto de *C. ficifolia* sobre la inflamación. Debido a la importancia del tejido adiposo blanco en la regulación de la producción de citocinas, la presente investigación planteó evaluar el efecto de un

extracto hipoglucemiante de *C. ficifolia* sobre las concentraciones séricas y la expresión génica en tejido adiposo de citocinas inflamatorias en ratones obesos. La finalidad del estudio es sentar las bases para proponer el extracto, como una alternativa terapéutica capaz de detener el estado inflamatorio y la resistencia a la insulina presente en la obesidad, previniendo así el desarrollo de la DT2 y sus complicaciones vasculares.

Se utilizó un modelo murino de obesidad inducido por la administración neonatal de glutamato monosódico, el cual presenta un estado inflamatorio crónico característico y resistencia a la insulina. Ratones obesos con cuatro meses de edad recibieron el extracto de *C. ficifolia* (200 mg/kg, vía intragástrica) por 30 días. Al finalizar el tratamiento se cuantificaron los niveles séricos y la expresión del RNAm en tejido adiposo de TNF- α , IL-6, resistina, IL-10 y adiponectina.

Los resultados mostraron que la administración de *C. ficifolia* disminuye significativamente los niveles séricos de TNFR2 e IL-6, así como la expresión del RNAm de las citocinas proinflamatorias resistina, TNF- α e IL-6 ($P < 0.05$). La administración de *C. ficifolia* no incrementó los niveles de las citocinas antiinflamatorias IL-10 y adiponectina. Aunque fue evidente una reducción estadísticamente significativa del RNAm de adiponectina ($P < 0.05$). Además, *C. ficifolia* redujo la resistencia a la insulina en los ratones obesos ($P < 0.05$). Estos resultados permiten concluir que el extracto hipoglucemiante de *C. ficifolia* tiene efecto antiinflamatorio en los ratones obesos lo cual se asocia con una disminución de la resistencia a la insulina.

Abstract

The overweight and the obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that may impair the health. According to the World Health Organization, in 2005 approximately 1.6 billion of adults had overweight, whereas 400 million of adults were obese. Overweight and obesity are considered risk factors for developing type 2 diabetes mellitus.

The obesity and diabetes are associated with a low grade-chronic inflammatory response, due to an abnormal production of cytokines. White adipose tissue plays an important role in this inflammatory process. In obesity, the excess of adipose tissue causes an inflammatory condition by abnormal production of cytokines, such as tumor necrosis factor type alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), resistin and adiponectin, which have been associated with the generation of insulin resistance.

The importance of inflammation in the generation of these pathologies has propitiated the search of new therapies for treatment of this illness. In Mexico, *Cucurbita ficifolia* is a plant used empirically in type 2 diabetes mellitus control. The aqueous extract from *C. ficifolia* fruit decreased serum levels of TNF- α and increased the levels of interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 10 (IL-10) in diabetic mice. However, the effects of *C. ficifolia* on the inflammation in obesity have not yet been studied. Because the importance of white adipose tissue in the regulation of cytokine production, in the present research it was proposed to evaluate the effect of daily administration of a hypoglycemic extract from *C. ficifolia* fruit on the serum levels and the gene expression of inflammatory cytokines in obese mice.

An obesity model induced by neonatal administration of monosodium glutamate was used, which presents a characteristic inflammatory state and insulin resistance. Obese mice with 4 months of age received *C. ficifolia* extract (200mg/kg) for 30 days by gastric gavage. At the end of the treatment serum levels and mRNA expression in adipose tissue for TNF- α , IL-6, resistin, IL-10 and adiponectin were quantified.

The results indicated that administration of *C. ficifolia* significantly decreased serum levels of TNFR2 and IL-6, as well as the mRNA expression of the proinflammatory cytokines resistin, TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$). The administration of *C. ficifolia* did not increase the levels of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and adiponectin. Although a significant reduction ($P < 0.05$) of adiponectin mRNA expression was observed. Also *C. ficifolia* reduced insulin resistance in obese mice ($P < 0.05$). In conclusion, these results suggest that the hypoglycemic extract of *C. ficifolia* has anti-inflammatory effect in obese mice, resulting in amelioration of the insulin resistance.

1. Introducción

1.1 Diabetes mellitus y obesidad

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, como consecuencia de defectos en la producción de insulina, en la acción de la insulina, o en ambas. La diabetes mellitus se clasifica en cuatro tipos: diabetes tipo 1 (DT1), diabetes tipo 2 (DT2), diabetes gestacional y otros tipos específicos. La DT1 se caracteriza por la falta de insulina debido a una alteración autoinmune y destrucción de las células beta del páncreas; la DT2 es causada por una reducción en la acción a la insulina, conjuntamente con una inadecuada secreción de ésta como respuesta compensatoria a la resistencia a la insulina; la gestacional y los otros tipos específicos pueden ser ocasionados por defectos genéticos en la función de las células beta o en la acción de la insulina, por enfermedades del páncreas exocrino o fármacos y agentes químicos que la induzcan. Comparando la incidencia entre diabetes T1 y T2, el porcentaje de casos de DT1 es del 5 al 10%, mientras que el de diabetes melitus tipo 2 es más elevado, con un 85 a 90% de casos (ADA, 2004). En el año 2000 la prevalencia mundial de la DT2 era de 171 millones de personas y se espera que afecte a 366 millones de personas en el 2030 (Wild y col., 2004). En México existe un prevalencia del 10.7 % de personas con diabetes (entre 6.5 y 10 millones) (FMD, 2009) y la incidencia nacional de la DT2 por año es de 404,770 (DGE, 2009).

Por otro lado, se conoce que debido a factores genéticos, por una nutrición inadecuada con un aumento de la ingesta de alimentos hipercalóricos y una

tendencia a la disminución de la actividad física, el número de personas con sobrepeso se ha incrementado (Misra y Khurana, 2008). La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser nocivo para la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone que el índice de masa corporal (IMC) en el sobrepeso es igual o superior a 25 Kg/m^2 , y en la obesidad el IMC es igual o superior a 30 Kg/m^2 . De acuerdo con la OMS, en el 2005 había en el mundo aproximadamente 1600 millones de adultos (mayores de 15 años) con sobrepeso y 400 millones de adultos obesos. Se calcula que en el 2015 habrá aproximadamente 2300 millones de adultos con sobrepeso y más de 700 millones con obesidad (WHO, 2009). México se encuentra en segundo lugar de obesidad en el mundo con una prevalencia de 24,4% ya que dos de cada tres mexicanos (mayores de 20 años) tienen sobrepeso u obesidad (FMD, 2009).

1.2 Desarrollo de la diabetes mellitus en la obesidad

Diversos estudios han relacionado a la obesidad como factor importante para el desarrollo de DT2 (Alberti y col., 2007). En pacientes obesos con DT2, así como en obesos no diabético insulinoresistentes, se ha evidenciado una reducción sustancial en la actividad tirosina-cinasa del receptor de insulina. Cuando el nivel de adiposidad corporal se incrementa, especialmente dentro de la cavidad abdominal, se genera un estado de disfunción adipocitaria caracterizado por adipocitos con resistencia a la insulina (Mendivil y Sierra, 2005; Rodríguez, 2000). En los individuos con obesidad y pacientes con DT2 el incremento de las citocinas proinflamatorias y el decremento de las antiinflamatorias se han relacionado con resistencia a la insulina y el desarrollo de complicaciones vasculares. Es importante resaltar este

dato, ya que el 75-80% de personas con DT2 mueren por enfermedades cardiovasculares (Alberti y col., 2007).

1.3 Participación del tejido adiposo en la inflamación

El tejido adiposo blanco (TAB) tiene una función importante en diversos procesos fisiológicos, como es en el control de la ingesta de alimentos, en el balance energético, en el metabolismo de la glucosa y lípidos, en la angiogénesis, así como en procesos proinflamatorios y antiinflamatorios (Bloomgarden, 2003). Se ha reconocido que el TAB produce moléculas llamadas adipocinas; sin embargo, en la obesidad su síntesis se encuentra desregulada en respuesta al exceso de adipocitos. Por lo que, en la obesidad y en las patologías asociadas a la misma, como la DT2, se presenta una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado caracterizada por la producción anormal de citocinas (Wellen y Hotamisligil, 2003; Guerre-Millo, 2004). A continuación se describen las características más importantes de las citocinas que han sido relacionadas con el proceso inflamatorio presente en la obesidad y la DT2.

1.3.1 Factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α)

El TNF- α fue la primera citocina que se relacionó con la resistencia a la insulina en la obesidad (Hotamisligil y col., 1993; Moller, 2000). Esta citocina es producida por el tejido adiposo y por otros tipos celulares, principalmente monocitos, linfocitos, miocitos y macrófagos. Ejerce sus acciones a través de dos receptores de membrana (TNFR1 y 2), los cuales experimentan proteólisis de su porción

extracelular al interactuar con su ligando, dando origen a las fracciones solubles del receptor (López-Jaramillo y col., 2005; Guido y col., 2005). La activación de TNF- α tiene como resultado la sobreexpresión de TNFR2 en tejido adiposo, incrementando los niveles de TNFR2 en el plasma de personas obesas; por lo que se relaciona con resistencia a la insulina. Estos datos sugieren que TNFR2 tiene una función importante en inducir la resistencia a la insulina por la acción de TNF- α (Strackowski y col., 2002). Se ha observado que el TNF- α presenta propiedades antagónicas a la insulina, ya que aumenta la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS) en residuos de serina o treonina, disminuyendo la fosforilación de los residuos de tirosina (Coppack, 2001). Esta citocina induce la fosforilación de IRS mediado por la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa reguladora del factor nuclear-kappa B (NF- κ B) (IKK- β). *In vivo*, el aumento de la actividad de IKK- β produce la fosforilación de IRS en el residuo de serina-307, mientras que dos isoformas de PKC, (PKC δ y PKC θ), pueden producir la fosforilación de serina/treonina, causando resistencia a la insulina (Evans, 2007; Steinberg, 2007). El bloqueo en la señalización intracelular de insulina inducido por el TNF- α se traduce en inhibición de las enzimas involucradas en la captación de ácidos grasos, en la captación de glucosa y en la síntesis de triglicéridos, causando, por tanto, hiperglucemia e incremento en la concentración de ácidos grasos libres en sangre (Mendivil y Sierra, 2005).

1.3.2 Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es secretada por varios tipos celulares: células del sistema inmune, fibroblastos, células endoteliales, músculo esquelético y tejido adiposo (Fernández-Real y Ricard, 2003). Esta citocina presenta potentes propiedades proinflamatorias.

Estudios realizados en ratones mostraron que esta citocina causa resistencia a la insulina en músculo esquelético y en hígado por defectos en la fosforilación de IRS-1 asociado con la actividad de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Tataranni y Ortega, 2005). Otros estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que al unirse IL-6 a sus dos tipos de receptores, conocidos como gp130 e IL-6R α (Kristiansen y Mandrup-Poulsen, 2005), se produce la activación de un factor de transcripción llamado traductor de señales y activador de transcripción-3 (STAT-3), que provoca la expresión de la proteína supresora de la señalización por citocinas (SOCS-3), factor que inhibe la autofosforilación del receptor de insulina y la fosforilación de IRS-1 e IRS-2, provocando un decremento en la gluconeogénesis y un aumento en la glucogenólisis (Emanuelli y col., 2000; Senn y col., 2003).

La IL-6 contribuye a desencadenar síndromes coronarios agudos al potenciar la síntesis de metaloproteasas y la expresión de receptores de LDL en los macrófagos, así como aumentar la captación de LDL y la secreción de sustancias quimiotácticas. También puede regular la expresión de moléculas de adhesión y citocinas, como la IL-1 β y el TNF- α , que incrementan la reacción inflamatoria (Fernández y Kaski, 2002).

1.3.3 Resistina

La resistina es una citocina secretada por preadipocitos, adipocitos (Stejskal y col., 2003) y células inmunológicas (Haluzik y col., 2006); en humanos esta citocina es principalmente secretada por los macrófagos (Tomaru y col., 2009) y en roedores por el TAB (Rajala y col., 2004). En la obesidad la expresión del mRNA de resistina

se incrementa en el adipocito (Haluzik y col., 2006) y es una citocina involucrada en la adipogénesis (Moon y col., 2003). Estudios *in vitro* sugieren que resistina puede incrementar la expresión de otras citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Además, en roedores afecta la tolerancia a la glucosa y produce resistencia a la insulina en el hígado (Tataranni y Ortega, 2005). Los efectos antagónicos de la resistina con respecto a la insulina son: reducción del transporte de glucosa dependiente de insulina, producción hepática de glucosa y aumento de la glucemia en ayunas (Schinner y col., 2005). En células hepáticas de la línea HepG2 la resistina induce la resistencia a la insulina a través de la expresión de SOCS-3, con una reducción en la fosforilación de la proteína cinasa B o Akt; además, incrementa la expresión de las enzimas gluconeogénicas (Luo y col., 2009).

En pacientes con aterosclerosis los niveles de resistina se han relacionado directamente con las concentraciones de TNFR2 e IL-6, y estudios en células endoteliales indican que resistina promueve la activación de las moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y de las moléculas de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y (Pang y Le, 2006).

1.3.4 Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que se encuentra alterada en el proceso inflamatorio; las bajas concentraciones de esta citocina en humanos está asociada con una predisposición a desarrollar diabetes (Tataranni y Ortega, 2005). Esta citocina es producida principalmente por un subtipo de linfocitos CD4+ (Th2) y

también en grandes cantidades por los macrófagos (De Vries, 1995). Cabe señalar que el TAB, además de contener adipocitos, está conformado por fibroblastos, preadipocitos y macrófagos. Los macrófagos producen moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias que son contribuyentes cruciales en el proceso inflamatorio sistémico general (Lumeng y col., 2007).

La citocina IL-10 es capaz de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos y por células T activadas a través de distintos estímulos. Se ha demostrado en cultivos de monocitos activados que esta citocina es capaz de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ (Fernández y Kaski, 2002). Se han propuesto varios mecanismos por los cuales IL-10 inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias: 1) IL-10 inhibe la activación del NF- κ B en monocitos y células T por medio de un proceso donde intervienen segundos mensajeros del tipo de radicales libres de oxígeno (Girndt y Kohler, 2003); 2) en monocitos y macrófagos IL-10 bloquea la translocación de NF- κ B al núcleo por la inhibición de la actividad de IKK (Asadullah y col., 2003); la inhibición de NF- κ B tiene como resultado reducción de la síntesis de interleucinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y quimiotácticos de células del sistema inmunológico, lo que limita la respuesta inflamatoria local en la placa aterosclerótica. Así, IL-10 parece ejercer un papel protector, limitando el desarrollo de la lesión aterosclerótica (Girndt y Kohler, 2003; Fernández y Kaski, 2002).

1.3.5 Adiponectina

La adiponectina es una citocina antiinflamatoria sintetizada específicamente por el adipocito. La mayor parte de su producción llega a la circulación sistémica. La adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina (Yoshiyuki y col., 2007), reduce la producción hepática de glucosa, estimula la β -oxidación de ácidos grasos en hígado, inhibe la adhesión de monocitos al endotelio vascular, la proliferación y la migración de células musculares lisas en la pared arterial (Schinner y col., 2005; Bastard y col., 2006; Takemura y col., 2007). Se han identificado dos receptores diferentes de adiponectina: el receptor AdipoR1, que se expresa primordialmente en músculo, y el AdipoR2, que lo hace en hígado (Mendivil y Sierra, 2005). La unión de adiponectina a AdipoR1 y AdipoR2 incrementa la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y también es capaz de activar los receptores activadores del proliferador de peroxisomas tipo alfa (*PPAR- α*) para que se lleve a cabo la oxidación de ácidos grasos y la internalización de la glucosa a la célula. Se propone que el mecanismo molecular de adiponectina para la regulación del metabolismo de glucosa y para disminuir la resistencia a la insulina está dado por la activación de AMPK y se ha observado que con el bloqueo de AMPK se inhiben estos efectos. La adiponectina al favorecer el incremento en la oxidación de los ácidos grasos, disminuye el contenido de triglicéridos en hígado y músculo esquelético. Este mecanismo también incrementa la sensibilidad a la insulina (Kadowaki y col., 2006).

2. Antecedentes

2.1 *Cucurbita ficifolia* Bouché: una planta utilizada para el control de la diabetes.

Para el control de la DT2 se utilizan varios fármacos hipoglucemiantes, como son las biguanidas, los derivados de las tiazolidinedionas, las sulfonilureas, etc. (Alberti y col., 2007). Sin embargo, aunque estos fármacos son de amplio uso clínico, la población también utiliza numerosas plantas medicinales.

En México el uso de plantas en la medicina tradicional es muy amplio. Existen plantas que se utilizan como antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales, antibacteriales, antidiabéticas, antioxidantes, etc. (Woyengo y col., 2009; Rathee y col., 2009). Se tienen reportes del uso de más de 350 plantas para el control empírico de la DT2 (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Entre estas plantas se encuentra *Cucurbita ficifolia* Bouché (*Cucurbitaceae*), la cual es conocida en México como “chilacayote” y es cultivada por sus frutos comestibles.

La actividad hipoglucemiante del fruto de *Cucurbita ficifolia* (*C. ficifolia*) ha sido estudiada a nivel experimental en ratas, ratones y conejos. En conejos con diabetes experimental inducida por alloxana a diferentes dosis, para inducir en estos animales diabetes moderada (glucemias entre 150-300 mg/dL) y severa (glucemia mayor a 300 mg/dL), se administró el jugo de fruto *C. ficifolia* a una dosis de 4 ml/kg, disminuyendo significativamente la glucemia sólo en conejos con diabetes moderada (Román y col., 1992). En estudios realizados en ratones sanos para observar el efecto de la administración de diferentes dosis del jugo de *C. ficifolia* por vía intraperitoneal y oral, se observó efecto hipoglucémico por ambas vías; además, las

dosis de 750 a 1250 mg/kg indujeron la muerte de los ratones. En otro estudio con la administración diaria por vía oral del jugo de *C. ficifolia* por 14 días a ratones tratados con alloxana se observó también disminución significativa de la glucemia (Alarcón y col., 2002). También se han realizado estudios de toxicología aguda con el jugo liofilizado de *C. ficifolia* en ratones, reportándose una dosis letal 50 (DL₅₀) por vía intraperitoneal de 625 mg/kg y por vía oral de 3689 mg/kg (Hernández y col., 2002). En pacientes diabéticos también se ha demostrado el efecto hipoglucémico de *C. ficifolia*. Pacientes con DT2 con glucemias entre 150-300 mg/dL recibieron un extracto de *C. ficifolia* a una dosis de 4 ml/Kg, la glucemia se monitoreó por 5 horas y se observó su disminución después de 3 h de haber sido ingerido el fruto (Acosta y col., 2001).

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

Se han realizado estudios con polisacáridos, formados por glucosa, galactosa y manosa, aislados a partir de *Cordyceps sinensis* Sacc., muestran efecto hipoglucémico en ratas con diabetes experimental inducida por estreptozotocina (Li y col., 2006; Yang y col., 2007). En el 2006, Xia y Wang aislaron un compuesto a partir del extracto metanólico de *C. ficifolia*, el D-quirositol, el cual mostró efecto hipoglucémico en ratas tratadas con estreptozotocina. Finalmente, se administró un extracto de *C. ficifolia* durante 30 días por vía oral, con 10 a 20 mg de D-quirositol por cada kg del peso del animal. El extracto fue capaz de incrementar los niveles de glucógeno hepático, la hemoglobina total, los niveles de insulina y disminuir los niveles de glucosa (Xia y Wang, 2006).

En nuestro laboratorio de farmacología de la UAM-I se ha determinado que la administración de *C. ficifolia* (200 mg/kg) disminuye los niveles de malondialdehído (producto de lipoperoxidación) y aumenta glutatión reducido en hígado de ratones diabéticos. A esta dosis *C. ficifolia* disminuye los niveles de TNF- α e incrementa IFN- γ , IL-6 e IL-10 en plasma de ratones con diabetes inducida con estreptozotocina. A pesar de que son varios los estudios que sustentan la actividad hipoglucemiante de *C. ficifolia*, aún falta conocer su mecanismo de acción, así como evaluar su influencia sobre los marcadores inflamatorios característicos de la obesidad.

3. Justificación

Se ha demostrado que la inflamación en la obesidad es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar DT2 y que ambas enfermedades están acompañadas de un proceso inflamatorio que contribuye al desarrollo de complicaciones vasculares.

Por otro lado, se tienen evidencias de que *C. ficifolia* tiene propiedades hipoglucemiantes, pero aún se desconocen los efectos benéficos que podría tener en las patologías asociadas con la DT2. En este trabajo se propone conocer si un extracto hipoglucemiante de *C. ficifolia* tiene efecto antiinflamatorio en ratones obesos, con la finalidad de sentar las bases para proponerlo como una alternativa terapéutica capaz de detener o aminorar el estado inflamatorio y la resistencia a la insulina presente en la obesidad, previniendo así el desarrollo de la DT2 y sus complicaciones vasculares.

4. Hipótesis

Si el extracto hipoglucemiante de *C. ficifolia* tiene efecto antiinflamatorio, entonces debe disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, resistina y TNF- α) y/o aumentar las antiinflamatorias (adiponectina e IL-10) en ratones obesos con resistencia a la insulina.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar si un extracto hipoglucemiante de *C. ficifolia* tiene efecto antiinflamatorio en ratones obesos con resistencia a la insulina.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la administración del extracto hipoglucemiante de *C. ficifolia* sobre los niveles de glucosa, hemoglobina glicada (A1c), triglicéridos, peso corporal y la resistencia a la insulina en ratones obesos.
- Evaluar la influencia de la administración del extracto de *C. ficifolia* sobre las concentraciones séricas de IL-6, IL-10, adiponectina, resistina y TNFR2 en ratones obesos.
- Evaluar la influencia de la administración del extracto de *C. ficifolia* sobre la expresión del RNAm de IL-6, IL-10, TNF- α , resistina y adiponectina en el tejido adiposo de ratones obesos.
- Relacionar el efecto del extracto sobre la expresión de las citocinas con el efecto producido en los parámetros bioquímicos de los ratones obesos.

6. Material y métodos

6.1 Preparación del extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia*.

El fruto de *C. ficifolia*, sin cáscara, libre de bagazo y semillas, fue cortado en rebanadas delgadas y se colocó en un recipiente para su deshidratación a temperatura ambiente y con aireación constante. El material seco fue triturado en un molino eléctrico marca Wiley, usando una rejilla de 1 mm de diámetro. Este material (400 g) fue sometido a una maceración con agua (4 L) durante 72 horas dentro de una campana de flujo laminar, cada 24 horas se recuperó la fase acuosa. Una vez obtenida la fase acuosa fue filtrada y centrifugada a 805 x g para obtener un precipitado, el cual fue separado y liofilizado, obteniendo un rendimiento del 1.9%. El producto liofilizado se disolvió en solución salina isotónica (SSI) para su administración en los ratones.

6.2 Inducción de obesidad en ratones.

Se ocuparon ratones hembras y machos de la cepa CD-1 del bioterio de la UAM-I, con un peso aproximado de 25-35 g. Estos ratones fueron distribuidos en cajas diferentes a razón de 3 hembras por 1 macho para realizar las cruza correspondientes; una vez que las hembras se encontraban preñadas fueron separadas.

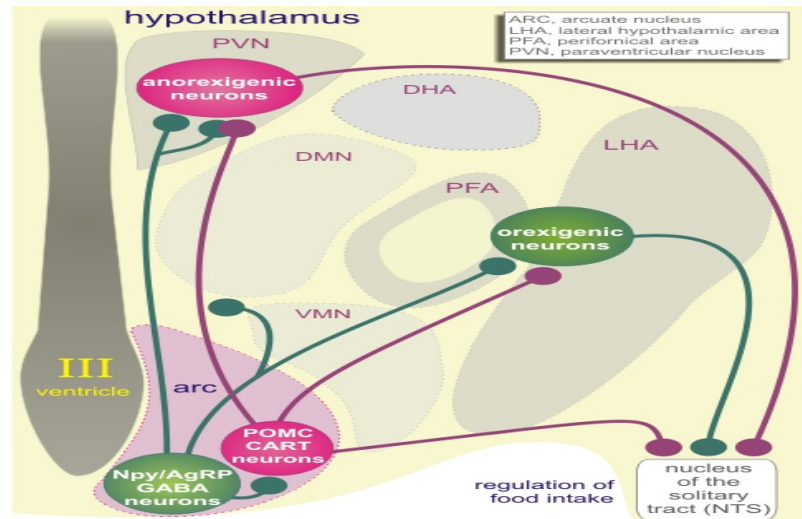
Las crías se distribuyeron en dos lotes, al nacer: a un lote se le administró SSI por vía subcutánea, en dosis de 0.01 ml/g de peso corporal, el segundo, cuarto, sexto, octavo y décimo día postnatal. Catorce semanas después de la

administración de la SSI se seleccionaron los machos y se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 12 ratones cada uno (Grupo 1, control sano; Grupo 2, *C. ficifolia* y Grupo 3, pioglitazona).

A un segundo lote de crías recién nacidas se les administró glutamato monosódico (GMS; Sigma Co.) por vía subcutánea a una dosis de 2 mg/kg de peso corporal disuelto en SSI al segundo y cuarto día postnatal, y 4 mg/kg de peso corporal, el sexto, octavo y décimo día postnatal. Catorce semanas después de la administración de GMS se seleccionaron los machos y se dividieron aleatoriamente en tres grupos de 12 ratones cada uno (Grupo 4, control obeso; Grupo 5, *C. ficifolia* y Grupo 6, pioglitazona).

El GMS es una sustancia que daña a las células del núcleo arcuato y neuronas circuventriculares del hipotálamo (Elefteriou y col., 2003). El hipotálamo contiene múltiples sistemas neuronales, que contribuyen a la regulación de la homeostasis del balance energético; algunos de estos sistemas estimulan el consumo de alimento (señales orexigénicas) y otros lo disminuyen (señales anorexigénicas). Los componentes hipotalámicos que intervienen en estas funciones son los núcleos arcuato, ventromedial, paraventricular, dorsomedial, supraóptico, supraquiasmático y el área hipotalámica lateral. El núcleo arcuato es uno de los núcleos más importantes del sistema, y se asocia con una función integradora del balance energético. Este núcleo contiene numerosas neuronas productoras de sustancias que controlan el apetito, como neuropéptido Y (NPY), derivados de proopiomelanocortina (POMC), transcriptasa relacionada con la cocaína-amfetamina

(CART), proteína r-Agouti (AgRP), ácido gamaaminobutírico (GABA) y glutamato (Esquema 1) (Perello y Spinedi, 2004).



Esquema 1. Moléculas secretadas por las neuronas del núcleo arcuato (arc) como POMC/CART (sustancias anorexigénicas) y NPY/AgRP/GABA (moléculas orexigénicas) y su interacción con el núcleo paraventricular (PVN), el área perifornical (PFA), área lateral hipotalámica (LHA) y núcleo del tracto solitario (NTS). Tomado de (Authesserre y col. 2009).

6.3 Determinación del peso corporal y parámetros bioquímicos.

A los ratones (cuatro meses de edad) se les determinó glucemia, A1c, triglicéridos y peso corporal antes de iniciar el tratamiento. La glucemia se cuantificó empleando un glucómetro Accutrend Sensor Comfort (Roche); la A1c con un aparato DCA 2000 (Bayer); el Reflotrón se utilizó para medir triglicéridos y la determinación del peso corporal se realizó en una báscula (OHAUS).

Después de la determinación de estos parámetros al inicio del experimento, se procedió a realizar la administración de los diferentes tratamientos por vía intragástrica durante 30 días. A los Grupos 1 y 4 se les administró SSI, a los Grupos

2 y 5 se les administró el extracto acuoso de *C. ficifolia* a una dosis de 200 mg/kg (0.6 mg de D-quirositol) y a los Grupos 3 y 6 se les administró pioglitazona a una dosis de 0.64 mg/kg. Al final de los tratamientos se volvieron a cuantificar los parámetros bioquímicos antes mencionados. Para la evaluación de la resistencia a la insulina se utilizaron 5 animales de cada grupo, mientras que para la cuantificación de citocinas inflamatorias se usaron el resto de los animales de cada uno de los grupos.

6.4 Evaluación de resistencia a la insulina.

Al final de los tratamientos se realizó una prueba de tolerancia a la insulina en 5 animales de cada grupo. Para lo cual, después de un ayuno de 10 h los ratones recibieron 0.75 UI/Kg de insulina por vía intraperitoneal y la glucemia se determinó a los 0, 15, 30 y 45 minutos.

6.5 Cuantificación de las concentraciones plasmáticas de citocinas.

Al final de los tratamientos, los animales de cada grupo se anestesiaron ligeramente con éter etílico y se obtuvieron aproximadamente 1.5 ml de sangre del seno orbital del ojo. Cada muestra se centrifugó a 419 x g y se obtuvo el suero para la cuantificación de las citocinas.

Las citocinas se cuantificaron en el suero de los ratones por el método de ELISA, con estuches comerciales de IL-6 e IL-10 (Pierce; Rockford, USA) y adiponectina, resistina y TNFR2 (R & D Systems; Minneapolis, USA). Las

absorbancias se midieron en un lector de ELISA a 450 nm de longitud de onda y se realizó la corrección de las lecturas a 595 nm.

6.6 Cuantificación de la expresión de citocinas por RT-PCR en tiempo real.

6.6.1 Extracción del RNA.

Para la extracción del RNA total se utilizó la metodología descrita por QIAGEN. Al cabo de cada uno de los tratamientos, se obtuvieron 100 mg de tejido adiposo del epidídimo.

Para el aislamiento del RNA, los 100 mg del tejido se homogenizaron con 1 ml del reactivo de Lisis QIAzol, en un homogenizador (Politron). Después, la muestra se mantuvo a temperatura ambiente (15-25° C) por 5 min. Se adicionaron 200 µl de cloroformo, se agitó 15 seg y se dejó a temperatura ambiente por 2-3 min. Después de centrifugar a 12,000 x g a 4° C por 15 min, se obtuvieron 3 fases: una fase acuosa transparente (superior) que contiene el RNA, una interfase blanca y una fase orgánica de color rojo (inferior). A la fase acuosa se le adicionaron 600 µl de etanol al 70% y se mezcló con ayuda de un vortex. Se tomaron 700 µl de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que pudiera formarse, y se pasó por una minicolumna; para filtrar se centrifugó a 8,117 x g por 15 seg a temperatura ambiente. Se repitió el paso anterior usando el resto de la muestra. Para lavar la columna se adicionaron 700 µl de Buffer RW1, se centrifugó por 15 seg a 8117 x g. La columna se lavó dos veces con Buffer RPE y después de cada lavado se centrifugó a 8,117 x g por 15 seg a temperatura ambiente. Para secar la membrana

del gel de silicona se centrifugó a 13,148 x g por 2 min y el filtrado se desechó. El RNA se recuperó en un tubo nuevo, se pasaron dos veces 30-50 µl de agua libre de RNasa sobre la membrana del gel de silicona; para filtrar se centrifugó cada vez por 1 min en las condiciones ya indicadas. El RNA se dividió en alícuotas que se almacenaron a -70° C hasta su uso.

Para la cuantificación y determinación de la pureza del RNA se determinaron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm. Para determinar la integridad del RNA, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer de electroforesis Tris-borato/EDTA (TBE), se tiñó con bromuro de etidio y la separación se realizó a 75 V por 45 minutos. La imagen se observó bajo luz ultravioleta y se capturó en un analizador de imágenes Gel Doc (BioRad).

6.6.2 Transcripción en reversa (RT).

La transcripción en reversa se realizó para sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa, usando un estuche de ImProm II. Se utilizaron 2 µg de RNA total; se adicionó una mezcla de iniciadores al azar (random primers 0.5 µg/µl) que están formados por seis nucleótidos, éstos se unen aleatoriamente al RNA para su retrotranscripción. La reacción se incubó en el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700, con el siguiente programa de ciclos: 25° C por 5 min, seguido por la extensión a 42° C por 55 min y la reacción se detuvo calentando a 70° C por 15 min y enfriando a 4° C por 5 min.

6.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa en “tiempo real” (PCR).

La amplificación del cDNA se llevó a cabo con la enzima DNA polimerasa usando un estuche de “DNA master plus SYBR Green 1” para las citocinas: IL-6, IL-10, resistina, adiponectina y TNF- α , así como también para el gen de normalización (una proteína ribosomal 36B4). Este proceso se realizó empleando el equipo LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany), que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo. Se preparó una mezcla de reacción con el cDNA de las citocinas descritos previamente o de 36B4, los primers forward y reverse correspondientes (Tabla 1), más la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂.

Las muestras se amplificaron en el LightCycler 2.0 de Roche, utilizando capilares de borosilicato de 20 μ l. Se utilizó un programa de amplificación para SYBR Green con un primer segmento de 10 min a 95° C para la preincubación de la enzima y desnaturalización, un segundo segmento de amplificación conformado por aproximadamente 40 ciclos y cada ciclo constituido por un alineamiento a 61° C por 7 seg a una rampa térmica de 20° C por seg; una amplificación a 72° C por 10 seg a una rampa térmica de 20° C por seg. La fluorescencia se cuantificó por cada ciclo.

A partir de un programa de análisis de temperatura de fusión (melting) se realizó la verificación de la amplificación específica. El programa consistió en una desnaturalización a 95° C con una rampa térmica de 20° C por seg, un realineamiento a 65° C durante 15 seg, a una rampa térmica de 20° C por seg; y por último, una desnaturalización lenta hasta 95° C a una rampa térmica de 0.1° C por seg y se cuantificó la fluorescencia de manera continua.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleotidos utilizados para la cuantificación del RNAm de las citocinas por RT-PCR en tiempo real	
Gen	Primer
TNF- α	F5'-CCTCCCTGTCATCAGTTCTA-3' R5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
Resistina	F5'-GTACCCACGGGATGAAGAACCG-3' R5'-GCAGAGCCACAGGAGCAG-3'
IL-6	F5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT -3' R5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC -3'
Adiponectina	F5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3' R5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3'
IL-10	F5'-CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA-3' R5'-TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG-3'
36B4	F5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3' R5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3'

Para verificar los productos obtenidos por PCR se utilizó el corrimiento de los productos por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Por último, para la cuantificación de la expresión se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$ (Dorak, 2009).

7. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA y utilizando como prueba complementaria Tukey-Kramer para evaluar las diferencias entre grupos, con un intervalo de confianza del 95%, mediante el paquete estadístico NCSS.

8. Resultados

8.1 Efecto hipoglucémico de *C. ficifolia* en ratones sanos.

Para comprobar si el extracto era capaz de disminuir las concentraciones de glucosa en sangre, se formaron dos grupos de ratones sanos, al grupo 1 se le administró por vía intragástrica el extracto a una dosis de 400 mg/Kg y al grupo 2 se le administró SSI, observando que el extracto de *C. ficifolia* redujo significativamente la glucemia después de seis horas de la administración, comparado con el grupo control (Figura 1).

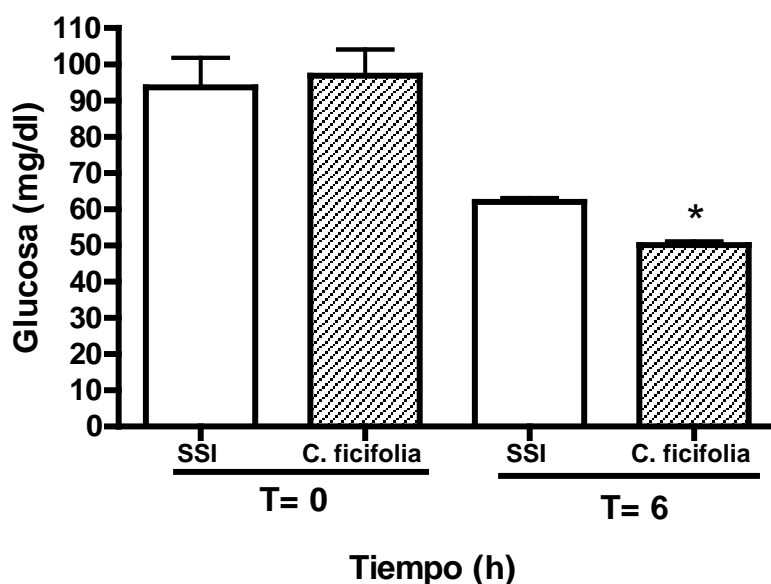


Figura 1. Estudio agudo con el extracto acuoso de *C. ficifolia*. Cuantificación de la glucosa al inicio y a las 6 h después de la administración de SSI y del extracto. Media \pm E.E.M. (n=6). *Diferencia significativa respecto al grupo control (p<0.05).

8.2 Efecto del extracto acuoso de *C. ficifolia* sobre el peso corporal y la ingesta de alimento en ratones sanos y obesos.

En la inducción de la obesidad se observó que de 60 ratones que fueron tratados con glutamato monosódico se obtuvo un 43.33% de hembras obesas y un 56.66% de machos obesos; sólo los machos fueron incluidos en este estudio. La administración subcutánea del GMS en los ratones neonatos provocó que estos animales, presentaran un exceso de tejido adiposo, en comparación con los ratones neonatos que sólo recibieron solución salina, a los cuatro meses de edad (Figura 2).

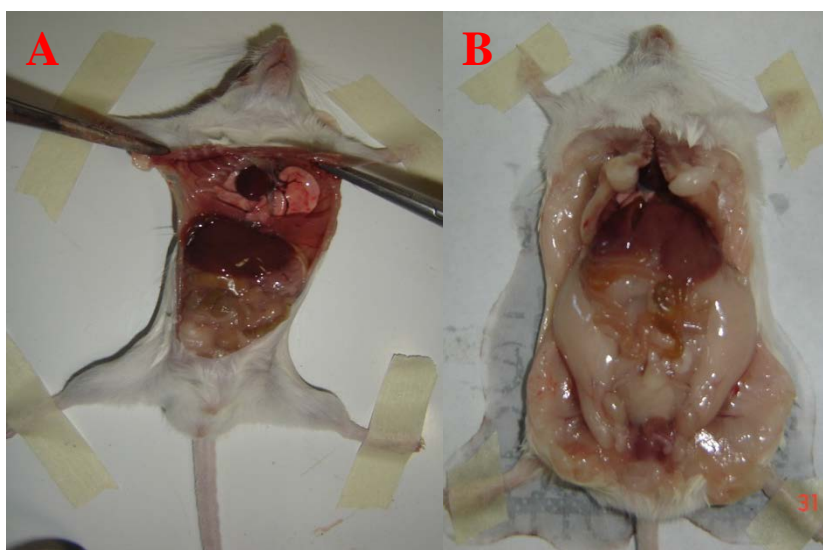


Figura 2. Imagen de un ratón normal (A) y un ratón al cual se le indujo obesidad por administración neonatal de glutamato monosódico (B) a los cuatro meses de edad.

En las siguientes gráficas se muestran las variaciones en el peso corporal observadas en cada uno de los grupos de ratones desde el inicio, a los 15 y 30 días después del tratamiento. El extracto de *C. ficifolia* causó una reducción significativa

del peso corporal después de 30 días de tratamiento, tanto en los ratones sanos (Figura 3A) como en los obesos (Figura 3B). La administración de pioglitazona en ambos modelos provocó un comportamiento similar al observado en los grupos control que sólo recibieron SSI.

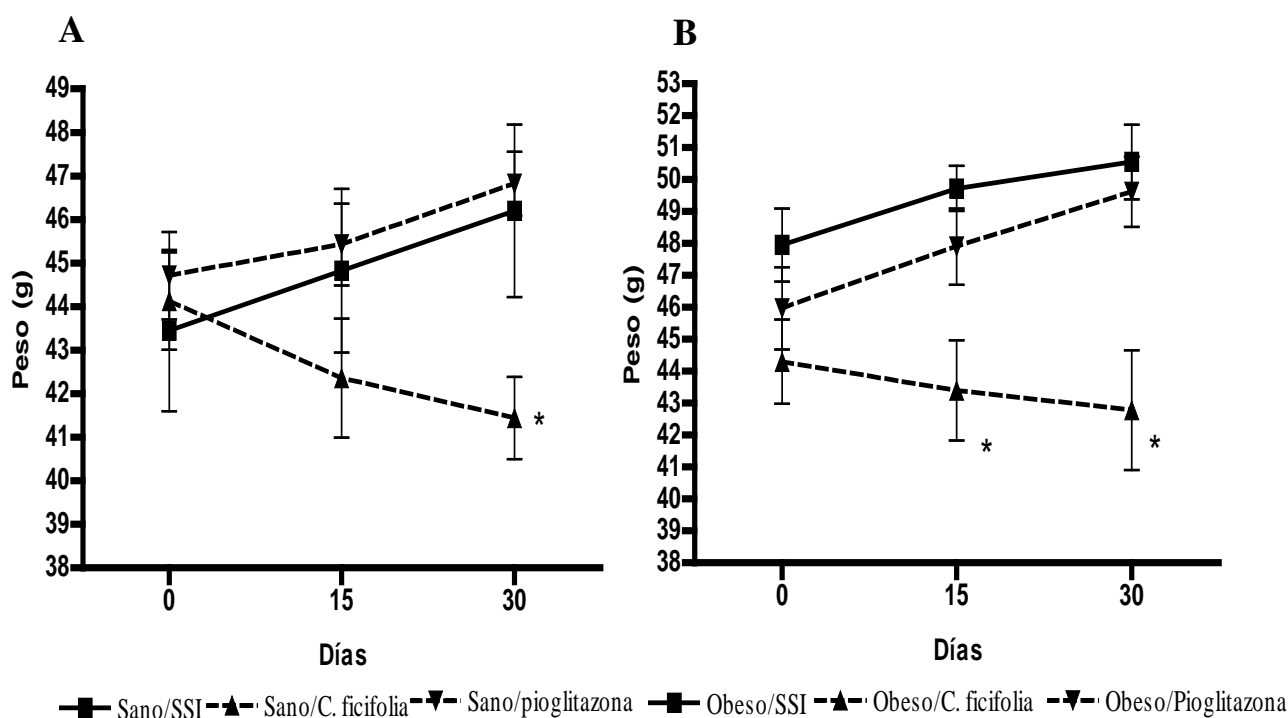


Figura 3. Peso corporal de los ratones sanos (A) y obesos (B) durante la administración de SSI, extracto de *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. (n=8). *Diferencias significativas con respecto al control sano y obeso ($p < 0.05$).

Desde el inicio hasta los 30 días de administración se monitoreó el consumo de alimento y se observó que los grupos de ratones sanos tratados con *C. ficifolia* y pioglitazona no mostraron cambios significativos con respecto al grupo control (Figura 4A). Mientras que en los animales obesos el extracto de *C. ficifolia* redujo significativamente el consumo de alimento con respecto al grupo control obeso (Figura 4B).

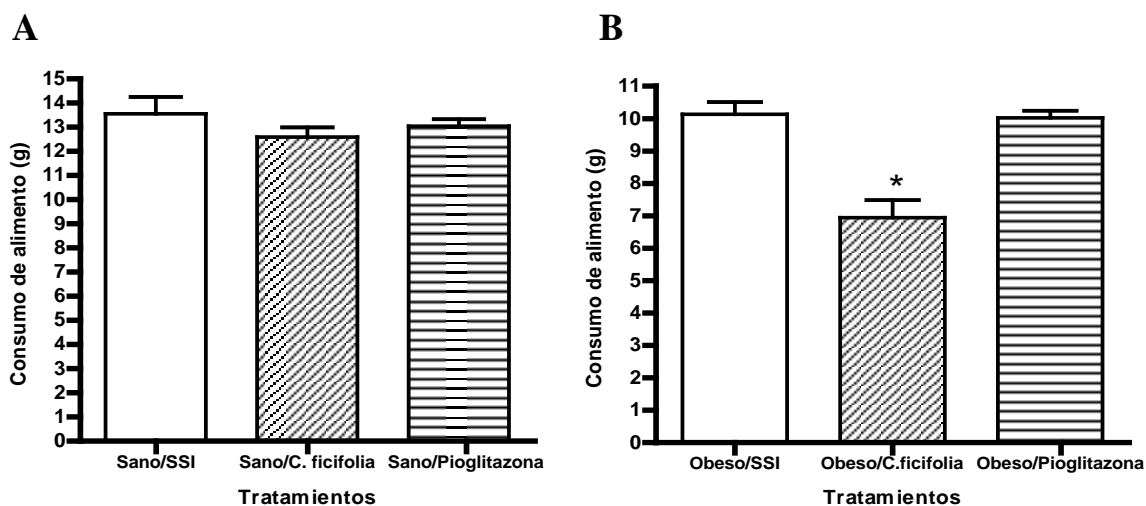


Figura 4. Cantidad de alimento consumido cada 48 horas por los animales sanos (A) y obesos (B) con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. (n=8). *Diferencias significativas con respecto al control obeso/SSI ($p < 0.05$).

8.3 Efecto del extracto de *C. ficifolia* sobre parámetros bioquímicos y evaluación de resistencia a la insulina en los ratones sanos y obesos.

En relación con los parámetros bioquímicos, se observó que a los 30 días de tratamiento los ratones sanos tratados con *C. ficifolia* mostraron una tendencia a la reducción de glucosa en sangre con respecto al grupo control (Figura 5A). Por su parte, en los ratones obesos la administración del extracto no mostró cambios importantes comparados con los otros grupos (Figura 5B).

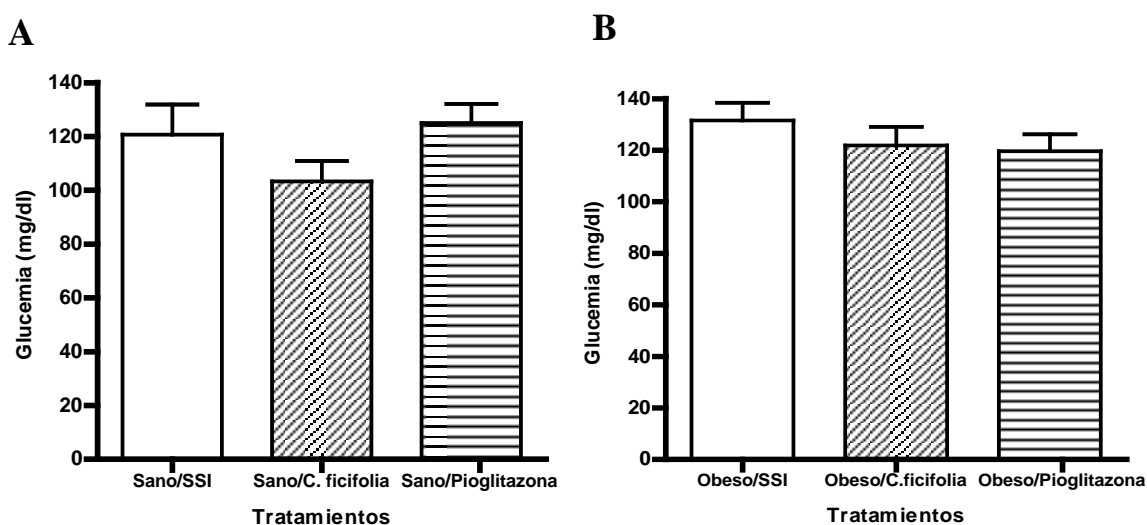


Figura 5. Glucemia en los ratones sanos (A) y obesos (B) después de 30 días de tratamiento con SSI, *C. ficifolia* o pioglitazona. Media \pm E.E.M. (n=8).

Otro parámetro que se cuantificó al final del tratamiento fue la A1c, la cual se redujo 0.26%, estadísticamente diferente en los ratones sanos tratados con *C. ficifolia* con respecto al control (Figura 6A). En el grupo obeso la administración de *C. ficifolia* no produjo modificaciones importantes con respecto al control obeso (Figura 6B).

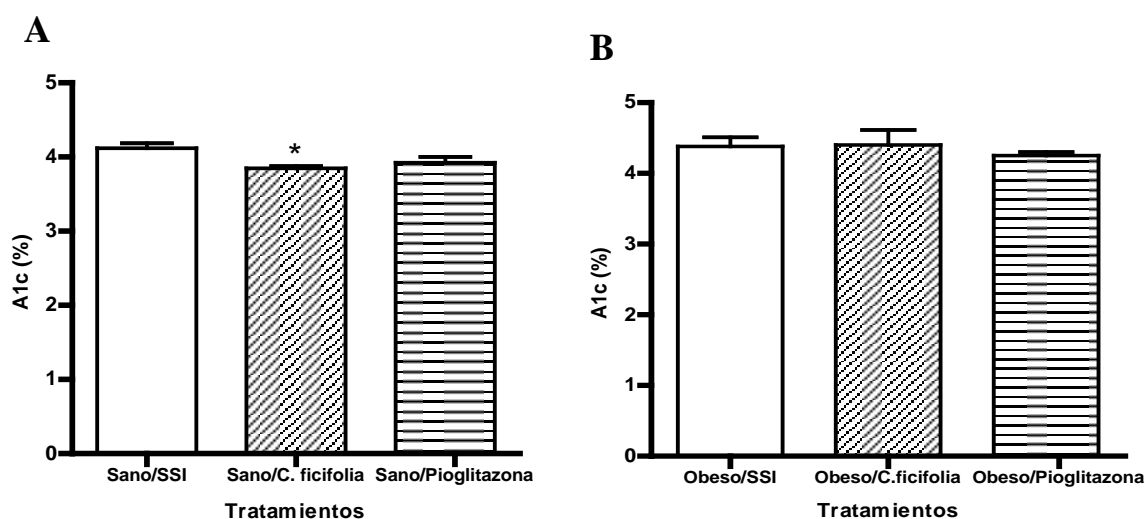


Figura 6. Niveles de A1c en los animales sanos (A) y obesos (B) con tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. (n=8). *Diferencias significativas con respecto al control sano/SSI ($p < 0.05$).

Por otra parte, la concentración de triglicéridos no cambió entre ratones sanos y obesos. Los tratamientos con *C. ficifolia* y pioglitazona no produjeron cambios con respecto al grupo control, por lo cual se obtuvieron valores menores a 70 mg/dL (datos no mostrados).

A los 30 días de tratamientos se evaluó la resistencia a la insulina, observando que los ratones sanos responden rápidamente a la administración de la insulina, disminuyendo los niveles de glucosa a los 45 minutos hasta valores de 10

mg/dL. Sin embargo, los ratones obesos no respondieron adecuadamente a la carga de insulina, por lo cual la glucemia se encuentra arriba de 60 mg/dL a los 45 minutos. La administración de *C. ficifolia* y pioglitazona en los ratones obesos produjo un efecto positivo sobre la respuesta a la insulina, ya que, en ambos casos, la glucemia se redujo significativamente con respecto al control obeso (Figura 7).

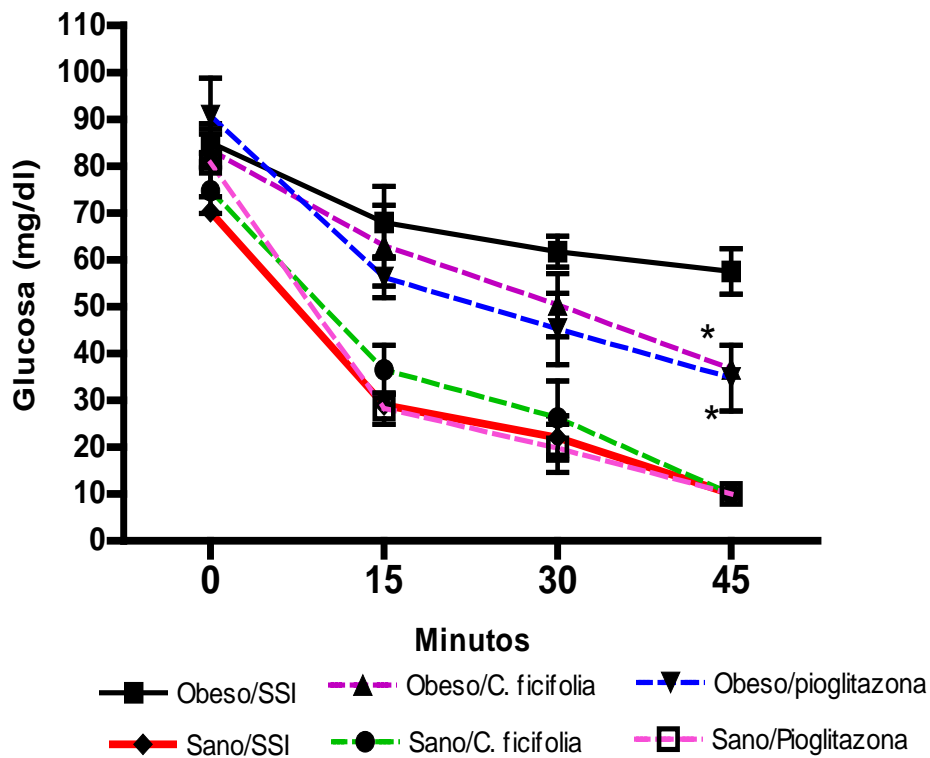


Figura7. Evaluación de resistencia a la insulina en animales sanos y obesos con tratamiento de SSI, *C. ficifolia* o pioglitazona. Media \pm E.E.M. (n=5). *Diferencias significativas con respecto al control obeso/SSI ($p < 0.05$).

8.5 Expresión de citocinas después del tratamiento con extracto de *C. ficifolia* en ratones sanos y obesos.

Una vez que se extrajo el tejido adiposo de los animales sanos y obesos, para la cuantificación de la expresión del RNAm de las citocinas, en primer lugar se aisló el RNA por el método de columna y por medio de espectrofotometría se determinó la pureza y la concentración de RNA obtenido. Es importante mencionar que la pureza fue determinada calculando la relación de las absorbancias obtenidas a 260 nm/280 nm; cuando ésta es mayor a 1.5 se indica que el RNA se encuentra puro y la muestra es apropiada para ser utilizada. Además, por electroforesis se determinó la integridad del RNA, observándose las bandas ribosomales 18S y 28S (Figura 8). La ausencia de bandas o la presencia de un barrido son indicativas de degradación del RNA en las muestras.

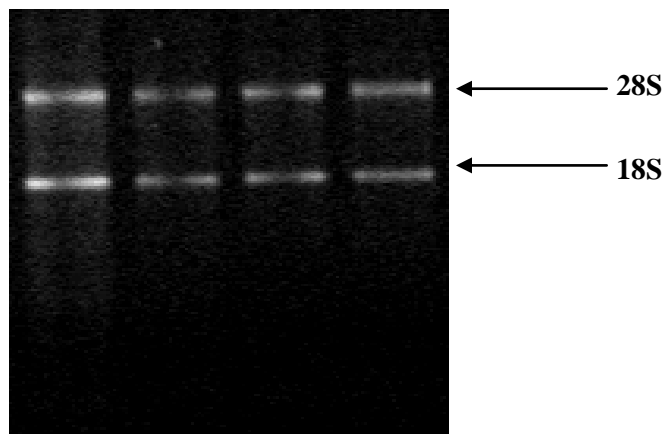


Figura 8. Integridad del RNA después de la extracción del mismo del tejido adiposo epididimal de ratones machos. El RNA total se analizó en geles de agarosa al 1%, marcado con bromuro de etidio, separación a 75 V por 45 minutos.

Después de realizar la extracción de RNA se llevó a cabo la retrotranscripción. Una vez obtenido el cDNA con el uso del equipo de PCR tiempo real se realizaron las curvas estándar utilizando diluciones seriales a partir de 1:10 hasta 1:10000 de una muestra control de cDNA para la amplificación del gen de cada citocina, así como del gen de referencia. Los genes estandarizados fueron para las siguientes citocinas: TNF- α , IL-6, IL-10, adiponectina, resistina y como gen de referencia el de la proteína ribosomal 36B4. En las curvas estándar de amplificación se obtuvo una eficiencia cercana a dos y un error alrededor de cero (Figura 9).

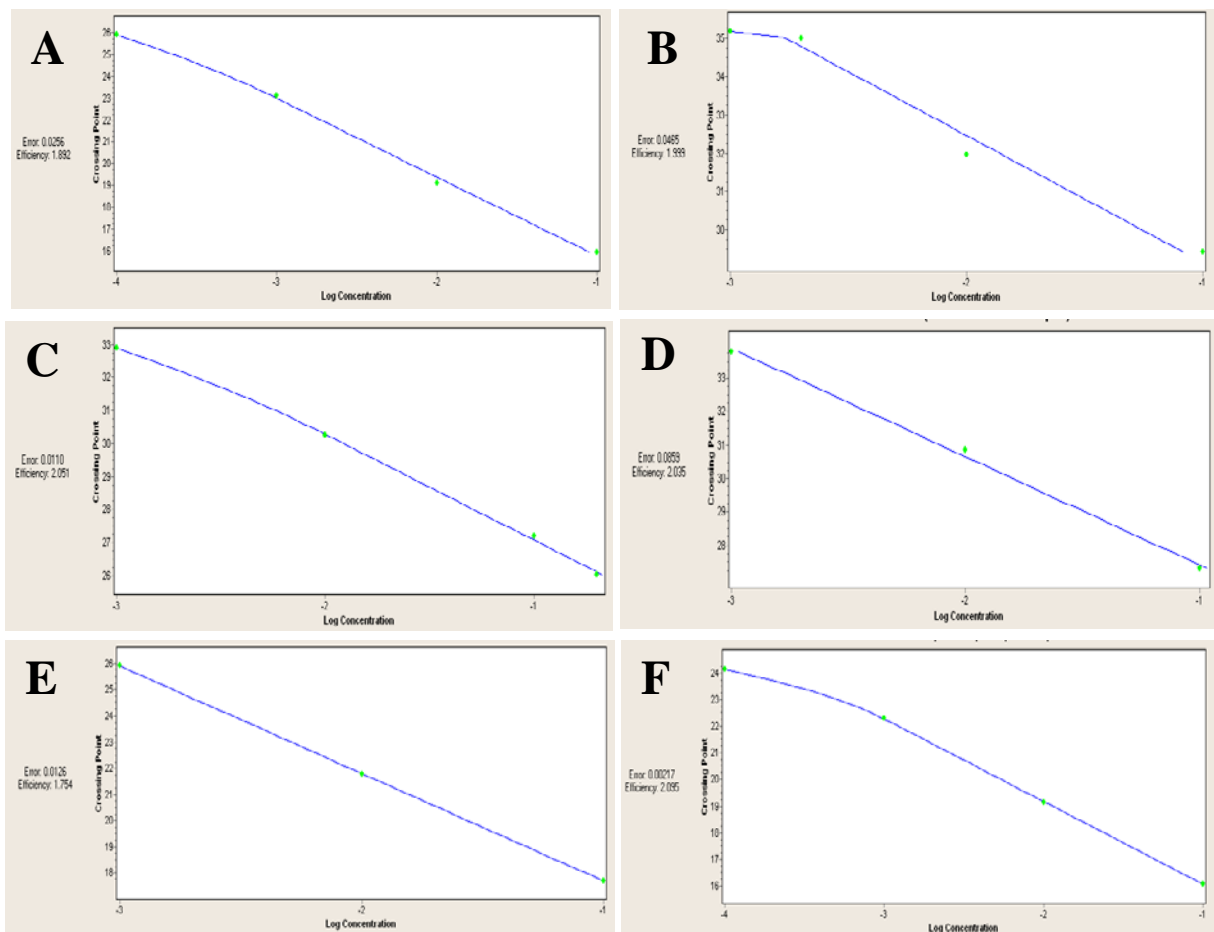


Figura 9. Curva estándar para la determinación de la expresión de adiponectina (A), IL-6 (B), TNF- α (C), IL-10 (D), resistina (E) y 36B4 (F).

Por último, por electroforesis se verificó la amplificación de las secuencias de interés. En la Figura 10 se muestra la presencia de los fragmentos amplificados que corresponden a: adiponectina (101 pb), IL-6 (129 pb), TNF- α (102 pb), IL-10 (163 pb) y resistina (253 pb).

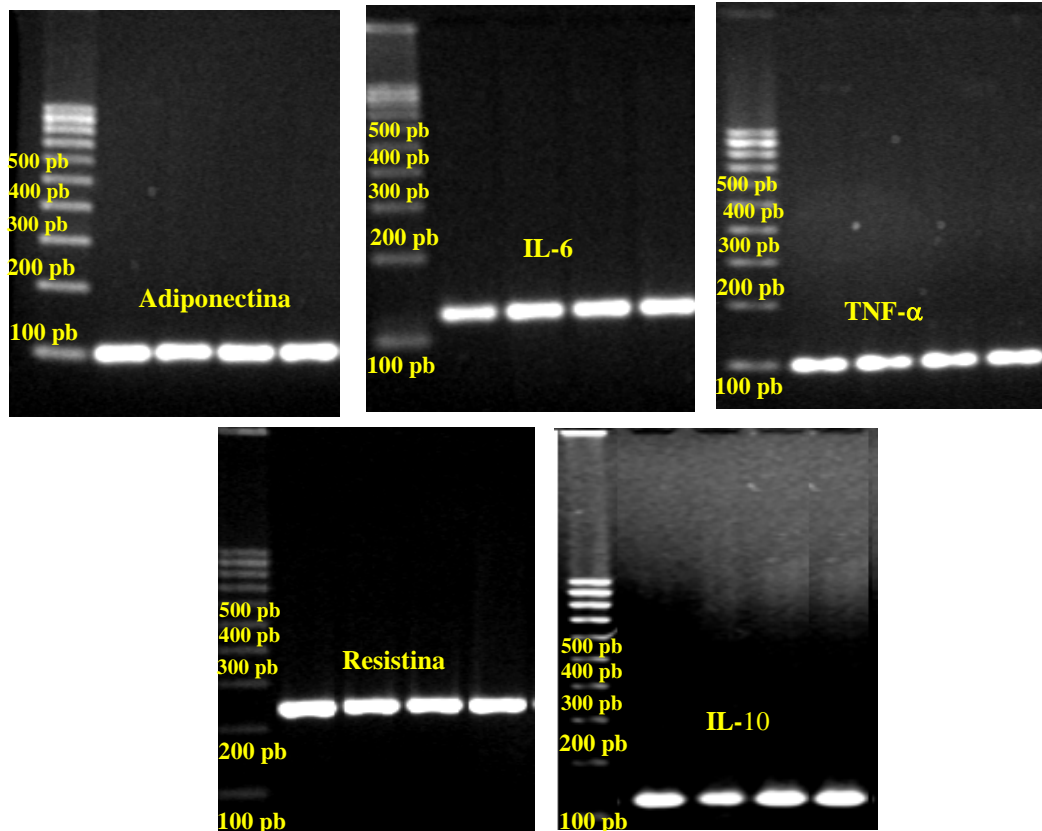


Figura 10. Análisis de los productos de amplificación: adiponectina, IL-6, TNF- α , resistina y IL-10. En geles de agarosa al 2%, marcado con bromuro de etidio, separación a 100 V por 45 minutos.

Los datos obtenidos sobre los niveles séricos y la expresión del RNAm en el TAB de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se describen a continuación. Los ratones sanos tratados con pioglitazona y extracto de *C. ficifolia* presentaron altas concentraciones de resistina en suero (Figura 11A) y de su RNAm en tejido adiposo (Figura 11B) con respecto al control. En los ratones obesos la pioglitazona produjo una disminución en las concentraciones de resistina, tanto en suero como

en la expresión del RNAm (Figura 12A-B), mientras que la administración del extracto no produjo un cambio significativo en los niveles séricos (Figura 12A) pero redujo significativamente la expresión de resistina en tejido adiposo (Figura 12B).

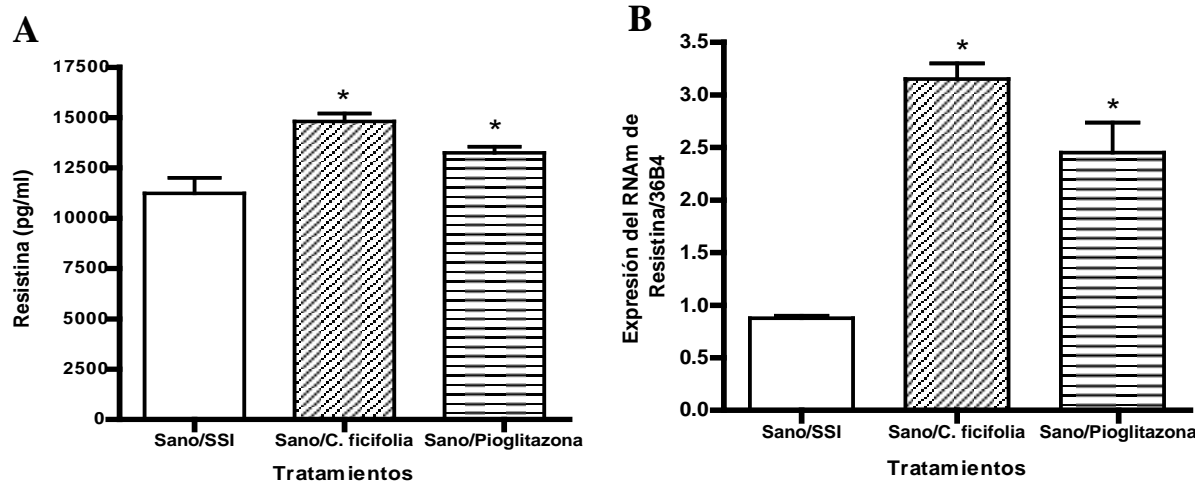


Figura 11. Niveles séricos (A) y expresión de resistina en tejido adiposo (B) en los ratones sanos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control sano/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

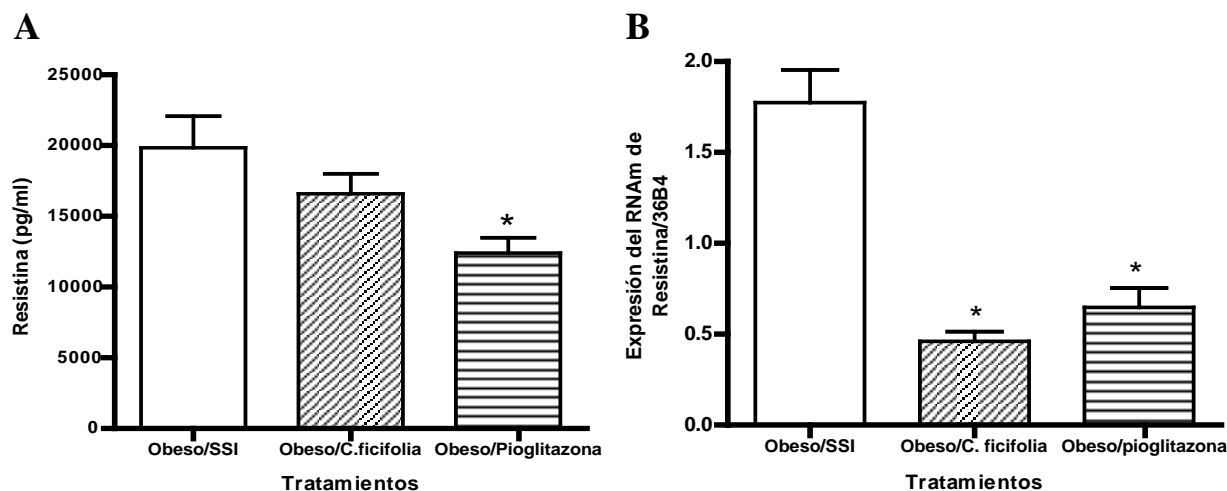


Figura 12. Concentraciones de resistina en suero (A) y expresión del RNAm en tejido adiposo (B) de ratones obesos con tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control Obeso/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

Respecto a IL-6 se observó que el grupo sano tratado con *C. ficifolia* no manifestó cambios en las concentraciones séricas de esta citocina (Figura 13A),

mientras que la expresión del RNAm se redujo significativamente con respecto al control (Figura 13B). Pioglitazona produjo un incremento significativo de IL-6 en suero sin producir cambios significativos en el RNAm tejido adiposo (Figura 13A-B). En los animales obesos se observó disminución de IL-6 en suero (Figura 14A) y expresión del RNAm en los grupos tratados con el extracto de *C. ficifolia* y pioglitazona (Figura 14A-B).

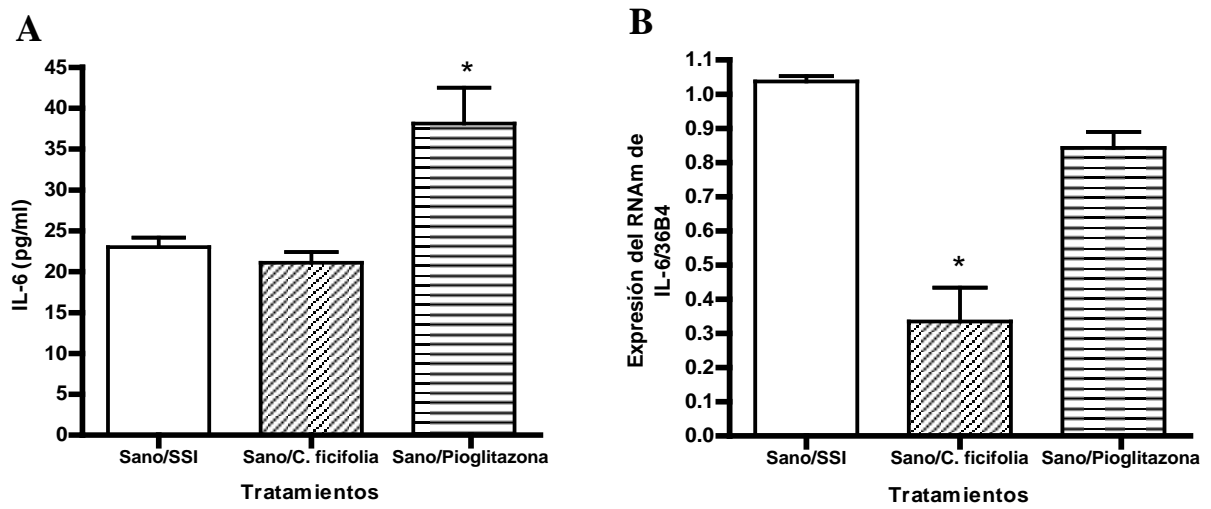


Figura 13. Concentraciones séricas de IL-6 (A) y expresión del RNAm en tejido adiposo (B) en los ratones sanos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias con respecto al control sano/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

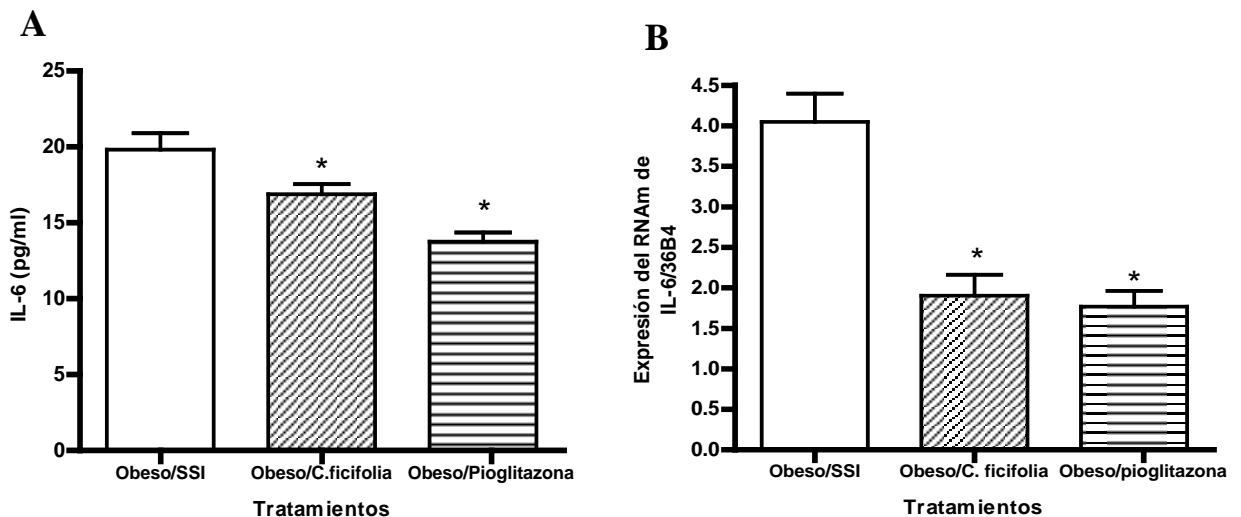


Figura 14. Concentraciones en suero (A) y expresión del RNAm de IL-6 (B) en los ratones obesos con la administración de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control Obeso/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

Acerca del receptor TNFR2, su medición se realizó para determinar indirectamente TNF- α en suero. La administración de *C. ficifolia* en los ratones sanos no mostró cambios significativos en los niveles séricos de TNFR2 (Figura 15A) pero redujo la expresión del RNAm de TNF- α en tejido adiposo (Figura 15B). El tratamiento con pioglitazona en los ratones sanos mostró un incremento significativo de TNFR2 en suero (Figura 15A) con una reducción significativa del RNAm de TNF- α (Figura 15B). En los ratones obesos tratados con *C. ficifolia* redujo significativamente la concentración de TNFR2 (Figura 16A) y el RNAm de TNF- α (Figura 16B). Por otra parte, pioglitazona disminuyó el RNAm de TNF- α en tejido adiposo de los animales obesos (Figura 16B).

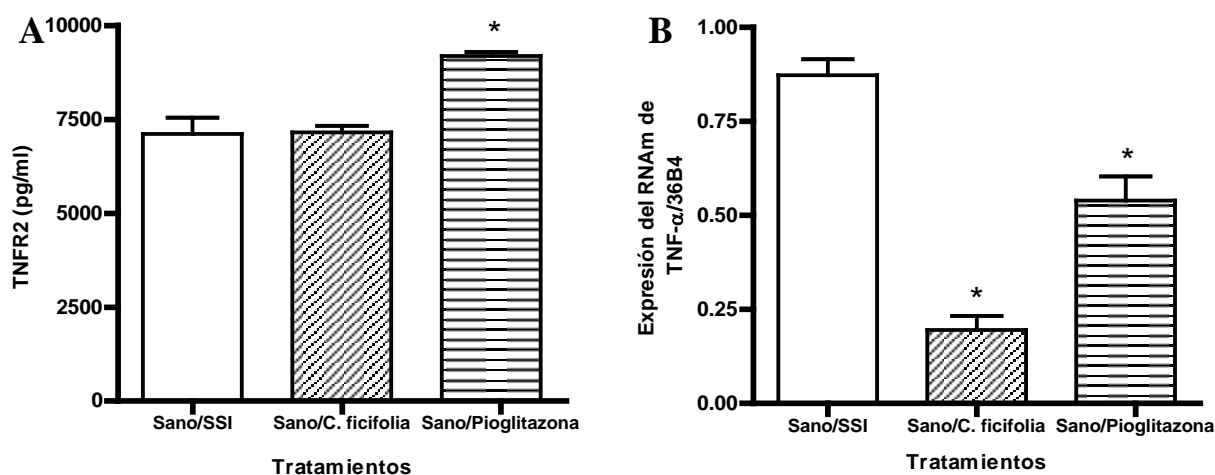


Figura 15. Niveles séricos de TNFR2 (A) y expresión del RNAm de TNF- α (B) en los ratones obesos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control sano/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

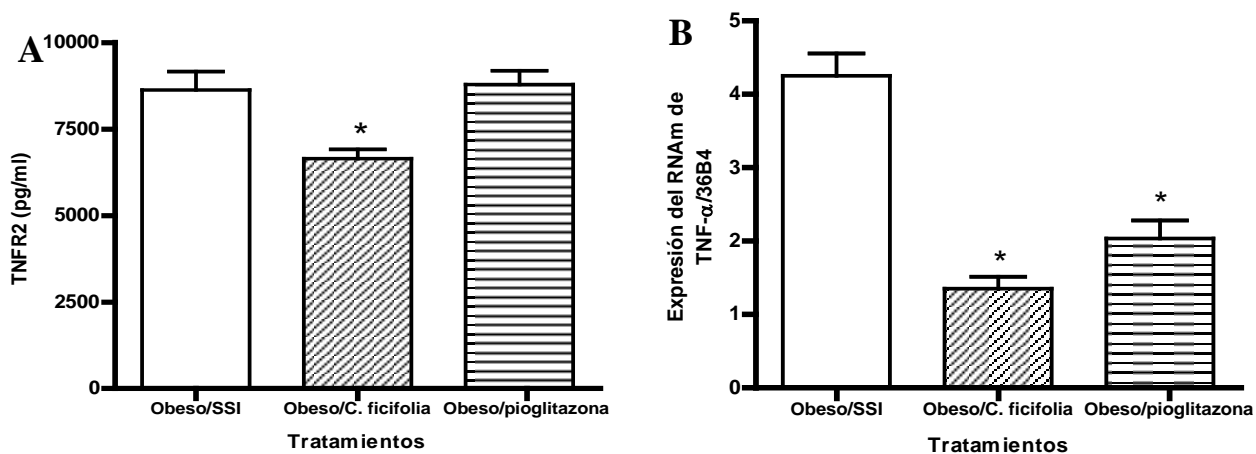


Figura 16. Concentraciones de TNFR2 (A) y expresión del RNAm de TNF- α (B) en los ratones obesos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control obeso/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

Una vez descritos los resultados con las citocinas proinflamatorias. A continuación se muestran los datos obtenidos sobre las dos citocinas antiinflamatorias IL-10 y adiponectina. La administración de pioglitazona y *C. ficifolia* en los ratones sanos incrementó significativamente los niveles de IL-10 en suero (Figura 17A) y del RNAm en el tejido adiposo (Figura 17B), aunque es importante mencionar que pioglitazona incrementó dos veces más las concentraciones normales de IL-10 que *C. ficifolia* (Figura 17A). Por su parte, en los animales obesos tratados con *C. ficifolia* y pioglitazona no se observaron cambios significativos con respecto al control, ni en los niveles séricos ni en la expresión del RNAm (Figura 18A-B).

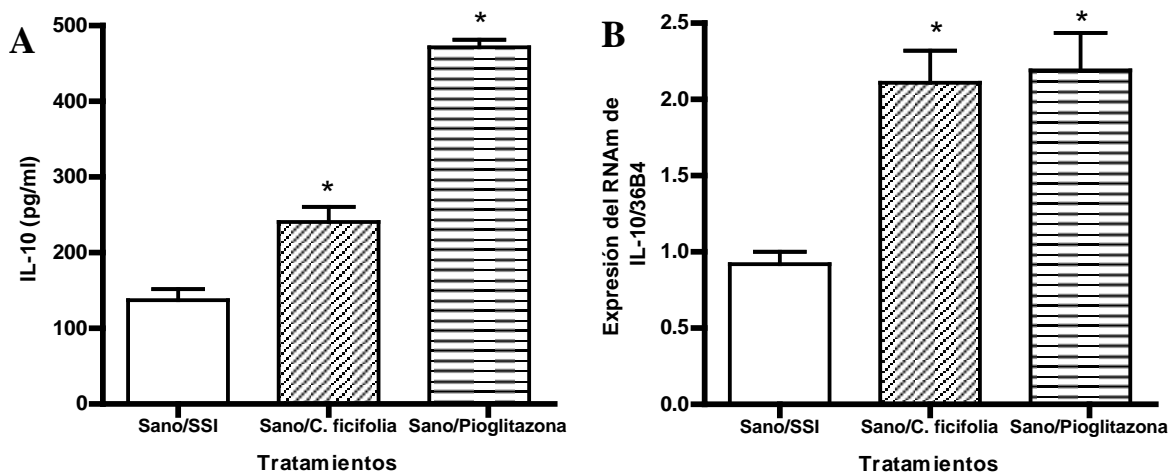


Figura 17. Concentraciones séricas (A) y expresión del RNAm de IL-10 en tejido adiposo (B) en los ratones sanos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control sano/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

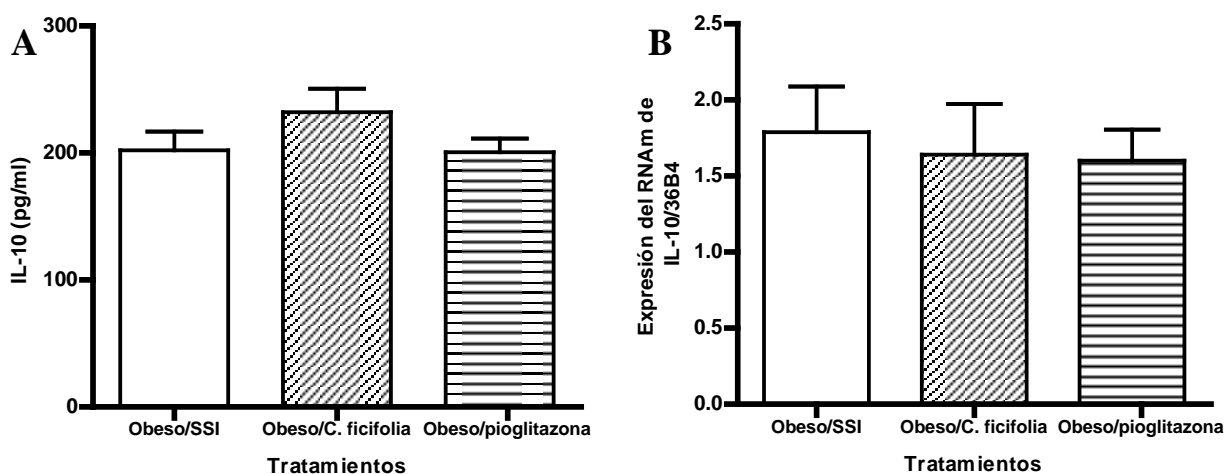


Figura 18. Niveles séricos (A) y RNAm de IL-10 (B) en los ratones obesos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

En los grupos sanos tratados con pioglitazona y *C. ficifolia* las concentraciones de adiponectina disminuyeron en suero con respecto al grupo control (Figura 19A) y pioglitazona indujo incremento en la expresión del RNAm de adiponectina (Figura 19B). En los ratones obesos la administración con pioglitazona produjo una tendencia al incremento de los niveles de adiponectina en suero (Figura 20A), mientras que la administración de *C. ficifolia* redujo la expresión del RNAm con respecto a los ratones obesos (Figura 20B).

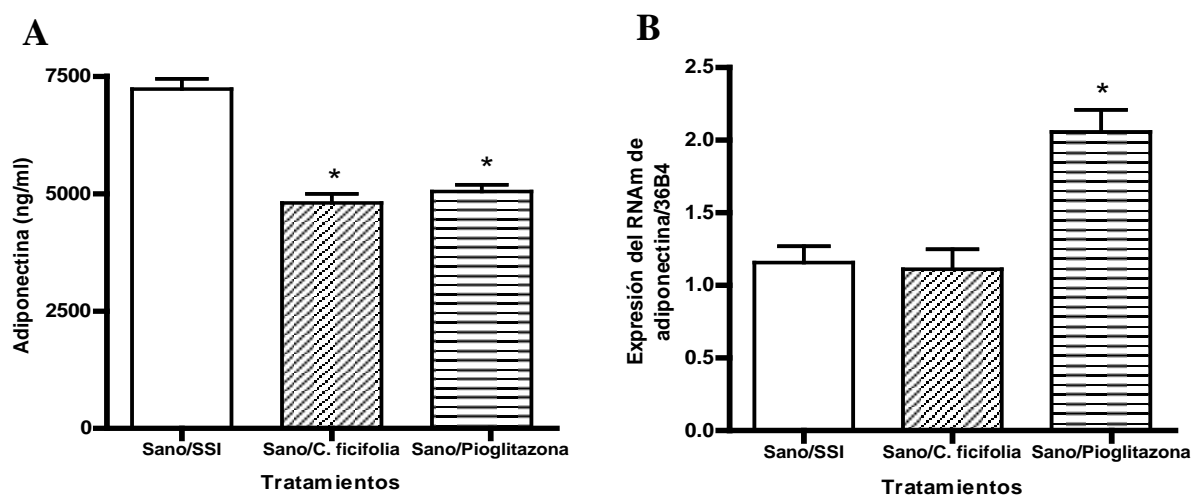


Figura 19. Niveles de adiponectina (A) y expresión del RNAm (B) en los ratones sanos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control sano/SSI ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

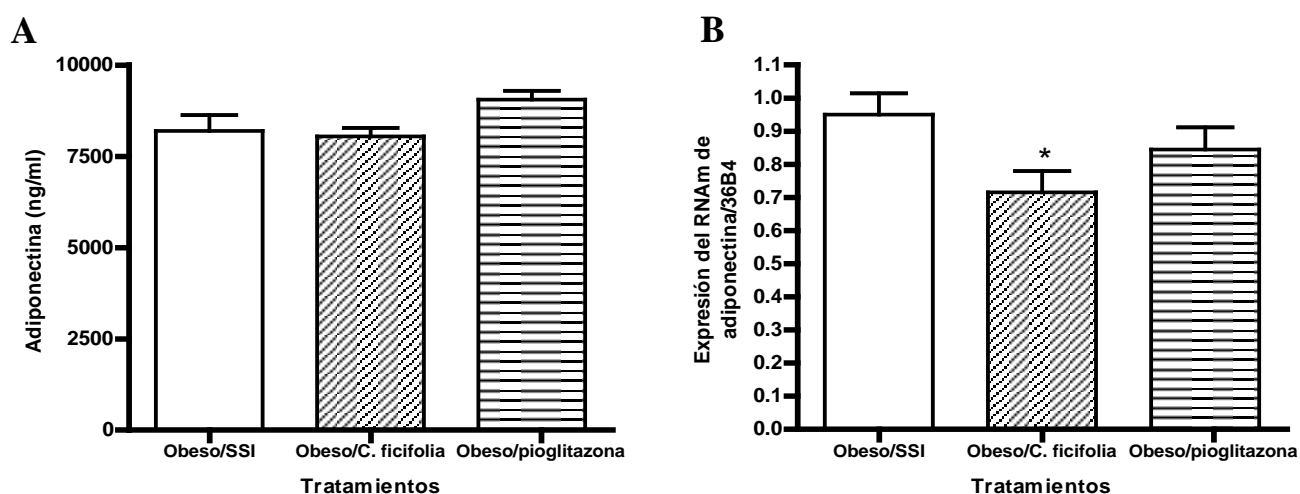


Figura 20. Concentraciones séricas y RNAm de adiponectina en tejido adiposo de los ratones obesos con el tratamiento de SSI, *C. ficifolia* y pioglitazona. Media \pm E.E.M. *Diferencias significativas con respecto al control obeso/SSI. *Diferencias significativas con respecto al control obeso/GMS ($p < 0.05$). Para la determinación de proteína se utilizó una $n=7$ y para RNAm $n=5$.

9. Discusión

La administración de GMS a ratones neonatos provoca la acumulación de una gran cantidad de tejido adiposo a partir de los cuatro meses de edad, además presentan una inflamación producida por el exceso de tejido adiposo, lo que los hace un modelo experimental apropiado para el estudio de procesos inflamatorios característicos de la obesidad.

En los ratones sanos como en obesos la administración del extracto de *C. ficifolia* redujo el peso corporal significativamente a los 30 días de tratamiento. Una característica importante del presente modelo obeso es la hipofagia, y los ratones obesos que recibieron el extracto de *C. ficifolia* disminuyó aún más el consumo de alimento en comparación con el control, por lo cual se sugiere que la disminución del peso es debida a reducción en el consumo de alimento por la administración diaria del extracto.

Otros modelos animales que presentan obesidad y resistencia a la insulina, son los ratones *ob/ob*, *db/db* y ratas Zucker, ya que estos modelos animales presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa y lípidos (Carley y Severson, 2005). En el presente estudio se determinó que los ratones obesos/GMS sin tratamiento, aún a la edad de cinco meses, tienen niveles de glucosa, A1c y triglicéridos normales, y el tratamiento con el extracto no modificó estos parámetros metabólicos. Por su parte, en los animales sanos tratados con el extracto de *C. ficifolia* se observó una tendencia a la reducción de glucosa y una reducción significativa del 0.26% de A1c, con respecto al grupo control. Estos resultados

también se han observado en animales con diabetes experimental (Ángeles-Mejía, 2006), lo cual indica que el extracto tiene un efecto importante sobre el metabolismo de la glucosa. El efecto hipoglucemiante de *C. ficifolia* podría deberse a un incremento en la secreción de incretinas como el péptido similar al glucagón (GLP-1) (Deane y col., 2009) y el péptido inhibidor gástrico (GIP) (Kim y col., 2007) a nivel intestinal, los cuales incrementan los niveles de insulina disminuyendo los niveles de glucosa en sangre. Además estos péptidos tienen un efecto protector sobre las células beta, incluyendo una reducción en la apoptosis y proliferación (Deane y col., 2009; Campbell, 2009)

La resistina, considerada una citocina proinflamatoria, se encontró incrementada significativamente en los animales sanos que recibieron *C. ficifolia*, así como en los que recibieron pioglitazona. Se propone que el incremento de resistina por el extracto de *C. ficifolia*, puede deberse a un incremento de la secreción de GIP, péptido que incrementa la expresión de resistina en tejido adiposo (Kim y col., 2007). Se ha determinado que la resistina tiene una importante función en la regulación de la lipólisis en adipocitos, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*: *in vivo* el incremento de resistina está acompañado por disminución del peso corporal (Koebnick y col., 2006). Por lo cual se sugiere que el extracto de *C. ficifolia*, al incrementar resistina, puede afectar el metabolismo de lípidos, causando la disminución en el peso corporal de los animales a los 30 días de tratamiento. El incremento de resistina por pioglitazona tiene correlación con algunos estudios realizados con rosiglitazona, otro fármaco del tipo de las tiazolidinedionas, la administración de rosiglitazona produce un incremento de esta citocina inflamatoria en ratones sanos; este fármaco al activar *PPAR-γ* es capaz de inducir la

transcripción de resistina junto con la actividad de C/EBP (Tomaru y col., 2009; Cho y col., 2008), entonces, la acción de pioglitazona se podría explicar por medio de este mismo mecanismo.

La resistina en ratón es una proteína producida principalmente por adipocitos y en humanos por macrófagos y monocitos (Gimeno y Klaman, 2005). En los animales obesos/GMS los niveles de resistina se encuentran altos niveles y la administración del extracto de *C. ficifolia* y pioglitazona disminuyen significativamente su expresión en tejido adiposo. Esto indica que los dos tratamientos disminuyen la inflamación en la obesidad. Cabe señalar también que la reducción de resistina por parte de *C. ficifolia* puede ser producto de la disminución en el peso corporal de los animales, como se explicó anteriormente. En ratas Zucker, que presentan DT2 y obesidad, se ha demostrado que la disminución en el peso produce una disminución en la expresión de resistina en el tejido adiposo (Milan y col., 2002).

El efecto diferencial producido por pioglitazona al incrementar resistina en los ratones sanos y disminuir esta citocina en ratones obesos, ya se ha reportado anteriormente, con el uso de otras tiazolidinedionas (Fukui y Motojima., 2002), lo cual indica que la expresión de resistina puede estar modulada no solo por la activación de *PPAR-γ* sino por otros factores que inhiban o activen su expresión.

En el presente estudio se midió indirectamente el TNF- α , por medio de la cuantificación de la concentración del receptor de TNFR2 ya que su concentración es proporcional a la cantidad de TNF- α en suero, siendo el receptor una proteína

más estable que la misma citocina (Straczkowski y col., 2002). En los ratones sanos la administración del extracto de *C. ficifolia* no alteró los niveles séricos de TNFR2 pero disminuyó la expresión RNAm del TNF- α . Además del tejido adiposo, diversas células del sistema inmunológico llevan a cabo la producción de TNF- α (Guido y col., 2005), por lo cual el efecto del extracto podría provocar una respuesta diferencial sobre las células del sistema inmune y el tejido adiposo. Otra explicación en la reducción de la expresión de TNF- α sólo en el tejido adiposo puede deberse al incremento de resistina, citocina que pudiera provocar un aumento en la lipólisis del tejido adiposo disminuyendo la cantidad de este tejido (Koebnick y col., 2006), y reduciendo la cantidad de moléculas secretadas por éste; lo cual provocaría una reducción del RNAm de TNF- α en tejido adiposo, sin producir cambios importantes en suero debido a que esta citocina puede provenir de otros tipos celulares. Este razonamiento también sustentaría la reducción del RNAm de IL-6 en el tejido adiposo, sin observarse cambios significativos en suero.

Las altas concentraciones de TNF- α e IL-6 en suero se relacionan directamente con la cantidad de tejido adiposo y resistencia a la insulina (Waki y Tontonoz, 2007; Gimeno y Klaman, 2005). Estas dos citocinas inflamatorias en los animales obesos/GMS se encuentran alteradas y la administración de *C. ficifolia* indujo su disminución, tanto de la proteína como del RNAm de TNF- α e IL-6, lo que indica que en estos animales se puede reducir la inflamación sistémica presente en la obesidad. También el tratamiento con pioglitazona disminuyó la inflamación al decrementar el RNAm y la concentración en suero de resistina, IL-6 y TNF- α en los ratones obesos/GMS, este efecto antiinflamatorio ya ha sido reportado, en ratones

db/db que fueron tratados durante 14 días con una dosis de 3 mg/kg (Mohapatra y col., 2009).

Mientras, que en los animales sanos la administración de pioglitazona incrementó significativamente los niveles de TNFR2 e IL-6 en suero. En pacientes con una enfermedad de hígado aguda o crónica se presentan altos niveles de IL-6, TNF- α , TNFR1 y TNFR2 (Tacke y col., 2009). Por lo cual, se sugiere que el incremento de IL-6 y de TNFR2 en los animales sanos con la administración de pioglitazona puede estar relacionado con un efecto hepatotóxico, ya que se tienen reportes de que éste es uno de los efectos adversos del fármaco (Tolman, 2000). El efecto de pioglitazona en los animales sanos no puede deberse a la dosis utilizada (0.64 mg/kg), ya que es una dosis mucho más baja a la terapéutica 30 mg/kg (Mohapatra y col., 2009), pero el efecto inflamatorio observado puede ser debido al tiempo de administración.

Con respecto a la adiponectina, citocina antiinflamatoria, se ha reportado que en las ratas Zucker y en los ratones ob/ob (modelos de obesidad) la adiponectina se encuentra en niveles bajos con respecto a los animales delgados (Milan y col., 2002, Delporte y col., 2004). Estos niveles de adiponectina favorecen la inflamación en la obesidad; cuando los animales disminuyen de peso se incrementa la concentración sérica de adiponectina produciendo una disminución de las citocinas inflamatorias (Milan y col., 2002; Delporte y col., 2004). En los ratones con obesidad generada por glutamato monosódico no se encuentra alterada la adiponectina con respecto al control sano. Aunque en los ratones obesos/GMS se observó que el tratamiento de *C. ficifolia* disminuye la expresión de las citocinas inflamatorias y también se observó

que disminuye significativamente la expresión del RNAm de adiponectina en el tejido adiposo. Esta respuesta podría estar asociada con la disminución del peso corporal. En este caso, *C. ficifolia*, al provocar la disminución del peso corporal, estaría provocando un efecto directo sobre la inhibición de *PPAR-γ*, factor de transcripción que regula la adipogénesis y la expresión de adiponectina (Schiffrin, 2003), por lo cual se observan niveles bajos de adiponectina. No se tienen otros reportes sobre este efecto del extracto de *C. ficifolia*, por lo que se desconoce cuál de sus componentes podría estar provocando esta respuesta. El extracto contiene algunos carbohidratos y se ha reportado que algunos oligosacáridos pueden disminuir la adipogénesis al inhibir la expresión de *PPAR-γ* y C/EBP (Cho y col., 2008), por lo que no se descarta que dichos compuestos pudieran participar en los efectos antiinflamatorios que muestra el extracto de *C. ficifolia*.

Por otra parte, *C. ficifolia* en los animales sanos no modifica la expresión del RNAm de adiponectina y el tratamiento con pioglitazona incrementa significativamente adiponectina, este incremento es debido a que el fármaco promueve la activación de *PPAR-γ*, aumentando la transcripción de adiponectina.

Aunque en los animales sanos la administración de *C. ficifolia* no modifica adiponectina, citocina antiinflamatoria, se observó que la administración del extracto incrementa significativamente IL-10, citocina que tiene características antiinflamatorias. Este efecto también puede estar relacionado con la disminución en el peso corporal. En humanos obesos se ha determinado que una disminución en el peso corporal se puede asociar con un incremento de IL-10 (Jung y col., 2008). Por otro lado, el aumento de IL-10 producido por el tratamiento de pioglitazona puede

explicarse tomando en cuenta el incremento de IL-6, citocina que en ciertas condiciones (daño hepático agudo), puede tener un efecto antiinflamatorio e inducir el incremento de IL-10 (Petersen y Klarlund, 2005; Xing y col., 1998).

Se ha descrito que tanto en ratones ob/ob, como los obesos/GMS presentan altos niveles de glucocorticoides (Delporte y col., 2004; Moreno y col., 2006). Los glucocorticoides son moléculas sintetizadas en la corteza adrenal; en ratones y humanos los principales son el cortisol y la corticosterona, y en obesidad hay una fuerte acción de éstos (Watts y col., 2005). Algunas de las funciones de los glucocorticoides son el aumento de la gluconeogénesis hepática en forma directa e indirecta, incrementando la respuesta a hormonas gluconeogénicas (glucagón y catecolaminas), estimulación de la proteólisis en tejidos periféricos, suministrando sustratos gluconeogénicos al hígado, inhibición de la captación de glucosa por tejidos periféricos, aumento de la lipólisis adipocitaria, aunque en forma crónica y asociados a la insulina pueden ser lipogénicos y alterar la distribución grasa (Perello y Spinedi, 2004). También se ha descrito que los glucocorticoides tienen función antiinflamatoria y pueden activar la transcripción de genes como el de IL-10 (Barnes, 1998; Adcock e Ito, 2000). En los ratones obesos/GMS encontramos niveles altos de IL-10 en suero con respecto a los ratones sanos; este incremento podría deberse a la alteración de los glucocorticoides, por lo anterior la administración del extracto o de pioglitazona ya no produjeron modificaciones importantes sobre esta citocina.

Los ratones obesos/GMS, como ya se ha reportado presentan hiperglucemia (no observada en el presente trabajo), hiperinsulinemia, hiperleptinemia (Moreno y col., 2006), resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Hirata y col., 1997).

La leptina y la insulina se regulan mutuamente, así, la leptina inhibe la producción de insulina en las células β del páncreas, mientras que la insulina estimula la producción de leptina en el adipocito (Pallett y col., 1997). Por esta razón, los ratones obesos/GMS presentan alteraciones en la secreción de insulina y de leptina. La DT2 y la obesidad se caracterizan por resistencia a la insulina, por lo cual fue importante determinar si el extracto era capaz de disminuir la resistencia a la insulina en los ratones obesos/GMS. Se confirmó en este estudio la resistencia a la insulina en los ratones obesos/GMS, y la administración tanto de *C. ficifolia* como de pioglitazona, aminoró la resistencia a la insulina. Por otra parte, se ha mostrado en algunos estudios que en tejido humano la deficiencia de D-quiro-inositol tiene una relación directa con la resistencia a la insulina y se ha demostrado que la administración de este compuesto a ratas diabéticas decrece la hiperglucemia (Larner y col., 1998). Por lo cual se ha sugerido que la molécula responsable del efecto hipoglucemiante de *C. ficifolia* es el D-quiro-inositol, al cual se le ha atribuido actividad insulino-mimética (Yap y col., 2007). Así, además de tener efecto sobre la glucemia, el extracto también tiene efecto antiinflamatorio, lo cual podría ser útil para reducir la resistencia a la insulina relacionada con obesidad.

En general, para tratar de explicar el efecto antiinflamatorio del extracto de *C. ficifolia* y sobre la resistencia a la insulina en los ratones obesos, el mecanismo sería el siguiente: al disminuir el estrés oxidativo por la acción de flavonoides (Kim, 2004), moléculas antioxidantes contenidos en el extracto de *C. ficifolia*, o por acción del D-quiroinositol, el cual se le ha demostrado que disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno (Nascimento y col., 2006), evitarían la activación de NF- κ B, disminuyendo así la expresión de las citocinas proinflamatorias. Aunque también los

flavonoides pueden actuar disminuyendo la expresión de cinasas involucradas en la transducción de señales de la proteína cinasa C (PKC) y MAPK, evitando así la activación de NF- κ B (Kim y col., 2004). El efecto antiinflamatorio puede estar potenciado por otras moléculas presentes en el extracto de *C. ficifolia* como las cucurbitacinas, moléculas con efecto antiinflamatorio (Chen y col., 2005). Y el contenido de oligosacáridos en el extracto pueden estar favoreciendo la disminución en el peso corporal por inhibición de *PPAR*- γ y la adipogénesis, efecto que también puede disminuir la producción de citocina inflamatorias por parte del tejido adiposo. La disminución en la expresión de citocinas inflamatorias ayuda a disminuir la resistencia a la insulina, pero también se propone que el contenido de D-quirositol afecta positivamente la transducción de señales de la insulina, incrementando la translocación de los transportadores de glucosa, GLUT4 (Figura 21).

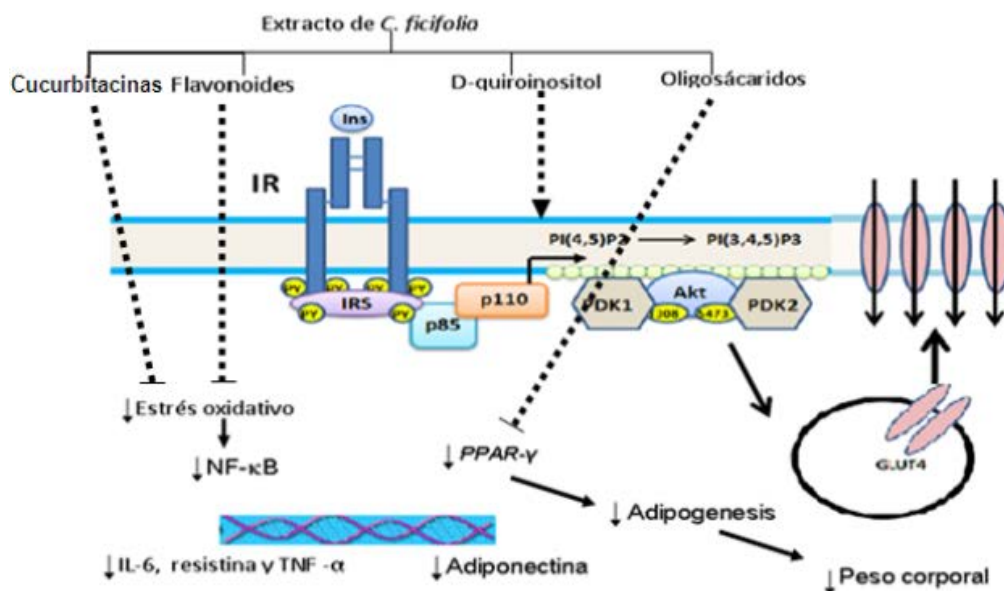


Figura 21. Mecanismo antiinflamatorio y acción insulino-mimética de *C. ficifolia* en el tejido adiposo.

10. Conclusión

La administración diaria del extracto de *C. ficifolia* redujo los niveles séricos de TNFR2 e IL-6 así como la expresión del RNAm de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y resistina en el tejido adiposo de ratones obesos/GMS.

El efecto antiinflamatorio de *C. ficifolia* observado en los ratones obesos también se observó en los ratones sanos, con un decremento en la expresión de TNF- α e IL-6 en tejido adiposo y un incremento de la citocina antiinflamatoria IL-10, tanto a nivel de RNAm como de proteína.

En relación con las citocinas antiinflamatorias en los ratones obesos, el extracto de *C. ficifolia* redujo la expresión del RNAm de adiponectina en el tejido adiposo, efecto que podría estar relacionado con la disminución del peso corporal.

El control positivo, pioglitazona, redujo la inflamación en los animales obesos, pero a diferencia del extracto en los ratones sanos, este agente aumentó la inflamación al incrementar los niveles de IL-6, TNFR2 y resistina.

Los resultados indican que el extracto hipoglucemiante de *C. ficifolia* podría ser una alternativa interesante para disminuir la inflamación presente en la obesidad, efecto que ayudaría a disminuir la resistencia a la insulina y prevenir el desarrollo de DT2.

10. Bibliografía

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

ADA, (2004). American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 27: S1-10.

Adcock IM, Ito K. (2000). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. Monaldi Arch Chest Dis. 55: 256-266.

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

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

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

Ángeles-Mejía S. (2006). Efecto antioxidante de *Cucurbita ficifolia* en ratones diabéticos. Servicio Social en Biología Experimental. Licenciatura en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. (2003). Interleukin-10 therapy - Review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 55: 241-269.

Authesserre N, Debourdeau G, Ostrofet E, Souleyreau W. (2009). Homeostatic regulation of food intake. <http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php> (Fecha de consulta: 11/Octubre/2009).

Azevedo-Meleiro CH, Rodriguez-Amaya DB. (2007). Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *J Agric Food Chem.* 55: 4027-4033.

Barnes PJ. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 94: 557-572.

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

Blancas-Flores G. (2007). Determinación de los niveles de expresión del RNAm de adipocinas por efecto de la glicina en ratones obesos. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Bloomgarden ZT. (2003). The Endocrine Society Meeting: topics in insulin sensitivity and hypertension. *Diabetes Care.* 26: 2679-2688.

- Campbell RK. (2009). Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *J Am Pharm Assoc* (2003). 49: S10-5.
- Carley AN, Severson DL. (2005). Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochem Biophys Acta*. 1734: 112-126.
- Chang CI, Chen CR, Liao YW, Cheng HL, Chen YC, Chou CH. (2008). Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *J Nat Prod*. 71: 1327-1330.
- Chen JC, Chiu MH, Nie RL, Cordell GA, Qiu SX. (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep*. 22: 386-399.
- Cho EJ, Rahman MA, Kim SW, Baek YM, Hwang HJ, Oh JY, Hwang HS, Lee SH, Yun JW. (2008). Chitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Microbiol Biotechnol*. 18: 80-87.
- Coppack SW. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 60: 349-356.
- De Vries JE. (1995). Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin-10. *Ann Med*. 27: 537-541.

Deane AM, Chapman MJ, Fraser RJ, Burgstad CM, Besanko LK, Horowitz M. (2009). The effect of exogenous glucagon-like peptide-1 on the glycaemic response to small intestinal nutrient in the critically ill: a randomised double-blind placebo-controlled cross over study. *Crit Care*. 13:R67.

Delporte ML, El Mkadem SA, Quisquater M, Brichard SM. (2004). Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 287: E446-453.

DGE. (2009). Dirección General de Epidemiología. www.dgepi.salud.gob.mx (Fecha de consulta: 18/Febrero/2009).

Dorak ,M.T. (2009). Real-Time PCR. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html> (Fecha de consulta: 04/Noviembre/2009).

Eleftheriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G. (2003). Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinology*. 144: 3842-3847.

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

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

Fernández P, Kaski JC. (2002). Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol.* 55: 738-750.

Fernández-Real JM, Ricart W. (2003). Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev.* 24: 278–301.

FMD. (2009). Federación Mexicana de Diabetes. www.fmdiabetes.com. (Fecha de consulta: 18/Febrero/2009).

Fukui Y, Motojima K. (2002). Expression of resistin in the adipose tissue is modulated by various factors including peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes Obes Metab.* 4: 342-345.

Gimeno RE, Klaman LD. (2005). Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. *Curr Opin Pharmacol.* 5: 122-128.

Girndt M, Kohler H. (2003). Interleukin-10 (IL-10): an update on its relevance for cardiovascular risk. *Nephrol Dial Transplant.* 18: 1976-1979.

Guerre-Millo M. (2004). Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 30: 13-19.

Guido G, Manrique E, Guido L. (2005). Síndrome cardiometabólico: inflamación, tejido adiposo, resistencia a la insulina y aterogénesis. *Acta Med Colomb.* 30: 100-111.

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

Hancock RD, Chudek JA, Walker PG, Pont SD, Viola R. (2008). Ascorbic acid conjugates isolated from the phloem of Cucurbitaceae. *Phytochemistry*. 69: 1850-1858.

Hernández E, Campos AE, Alarcon FJ, Vazquez L, Flores JL, Roman R. (2002). Acute toxicological study of *Cucurbita ficifolia* juice in mice. *Proc West Pharmacol Soc*. 45: 42-43.

Hirata AE, Andrade IS, Vaskevicius P, Dolnikoff MS. (1997). Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Braz J Med Biol Res*. 30: 671-674.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 259: 87-91.

Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, Kim SM, Lee SY, Ahn SM, Kim YK, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW. (2008). Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem*. 19 : 371-375.

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

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 96: 229-245.

Kim SJ, Nian C, McIntosh CH. (2007). Resistin is a key mediator of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of lipoprotein lipase (LPL) activity in adipocytes. *J Biol Chem.* 282: 34139-34147.

Koebnick C, Wagner K, Garcia AL, Gruendel S, Lahmann PH, Weickert MO, Möhlig M, Harsch IA, Einig C, Speth M, Katz N, Trippo U, Zunft HJ. (2006). Increase in serum resistin during weight loss in overweight subjects is related to lipid metabolism. *Int J Obes (Lond).* 30: 1097-10103.

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

Larner J, Allan G, Kessler C, Reamer P, Gunn R, Huang LC. (1998). Phosphoinositol glycan derived mediators and insulin resistance. Prospects for diagnosis and therapy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 91: 27-37.

Li SP, Zhang GH, Zeng Q, Huang ZG, Wang YT, Dong TT, Tsim KW. (2006). Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine*.13: 428-433.

López-Jaramillo P, Pradilla PL, Bracho Y. (2005). Papel del adipocito en la inflamación del síndrome metabólico. *Acta Med Colomb*. 30: 135-149.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 117: 175-185.

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

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

Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R. (2002). Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res*. 10: 1095-10103.

Misra A, Khurana L. (2008). Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab*. 93: S9-30.

Mohapatra J, Sharma M, Singh S, Chatterjee A, Swain P, Balaraman R, Patel PR, Jain MR. (2009). Subtherapeutic dose of pioglitazone reduces expression of inflammatory adipokines in db/db mice. *Pharmacology*. 84:203-210.

Moller DE. (2000). Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 11: 212-217.

Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Begum N. (2003). Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 285:E106-115.

Moreno G, Perelló M, Camihort G, Luna G, Console G, Gaillard RC, Spinedi E. (2006). Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamo-damaged, hyperadipose female rats. *Int J Obes (Lond)*. 30: 73-82.

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

Pallett AL, Morton NM, Cawthorne MA, Emilsson V. (1997). Leptin inhibits insulin secretion and reduces insulin mRNA levels in rat isolated pancreatic islets. *Biochem. Biophys Res Commun*. 238: 267-270.

Pang SS, Le YY. (2006). Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol.* 3: 29-34.

Perello M, Spinedi E. (2004). Aspectos neuroendocrinos de la obesidad. *Medicina.* 64: 257-264.

Petersen AM y Klarlund B. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Appl Physiol.* 98: 1154–1162.

Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS. (2004). Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes.*53:1671-1679.

Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 8: 229-235.

Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. (2004). Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Med.* 70: 414-420.

Rodríguez Y. (2000). Interpretaciones recientes sobre el metabolismo lipídico en la resistencia a la insulina. *Aliment Nutr.* 16: 54-62.

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

Schiffrin EL. (2003). Efectos cardiovasculares de los receptores activadores del proliferador de peroxisomas (PPAR) en hipertensión. Boletín del Consejo Argentino de H.T.A. 2: 14-18.

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

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

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

Stejskal D, Adamovská S, Bartek J, Juráková R, Prošková J. (2003). Resistin concentrations in persons with type 2 diabetes mellitus and in individuals with acute inflammatory disease. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 147: 63-69.

Straczkowski M, Kowalska I, Stepień A, Dzienis-Straczkowska S, Szelachowska M, Kinalska I. (2002). Increased plasma-soluble tumor necrosis factor-alpha receptor 2

level in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 25: 1824-1828.

Tacke F, Luedde T, Trautwein C. (2009). Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol*. 36: 4-12.

Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber MT, Summer RS, Kihara S, Walsh K. (2007). Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor –dependent clearance of early apoptotic bodies. *J Clin Invest*. 117: 375-386.

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

Tolman KG. (2000). Thiazolidinedione hepatotoxicity: a class effect?. *Int J Clin Pract Suppl*. 113: 29-34.

Tomaru T, Steger DJ, Lefterova MI, Schupp M, Lazar MA. (2009). Adipocyte-specific expression of murine resistin is mediated by synergism between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem*. 284: 6116-6125.

Waki H, Tontonoz P. (2007). Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol*. 2: 31-56.

Wang DC, Xiang H, Li D, Gao HY, Cai H, Wu LJ, Deng XM. (2008). Purine-containing cucurbitane triterpenoids from *Cucurbita pepo* cv dayangua. *Phytochemistry*. 69: 1434-1438.

Watts LM, Manchem VP, Leedom TA, Rivard AL, McKay RA, Bao D, Neroladakis T, Monia BP, Bodenmiller DM, Cao JX, Zhang HY, Cox AL, Jacobs SJ, Michael MD, Sloop KW, Bhanot S. (2005). Reduction of hepatic and adipose tissue glucocorticoid receptor expression with antisense oligonucleotides improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic rodents without causing systemic glucocorticoid antagonism. *Diabetes*. 54: 1846-1853.

Wellen KE, Hotamisligil GS. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112: 1785-1788.

WHO. (2009). World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html> (Fecha de consulta: 20/Agosto/2009).

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004). Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27: 1047–1053.

Woyengo TA, Ramprasath VR, Jones PJ. (2009). Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr*. 63: 813-820.

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

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. (1998). IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Clin Invest.* 101: 311-20.

Yang X, Zhao Y, Lv Y. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of an acidic polysaccharide extracted from *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret. *J Agric Food Chem.* 55: 4684-4690.

Yap A, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H. (2007). Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology.* 55: 103-108.

Yoshiyuki H, Sachiko H, Kazumi A, Toshio N, Kunihiro S, Hiroaki M, Kikuo K. (2007). Globular adiponectin activates nuclear factor-B and activating protein-1 and enhances angiotensin II induced proliferation in cardiac fibroblasts. *Diabetes.* 56: 804-808.