



Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Cucurbita ficifolia Bouché aumenta la secreción de insulina en la línea celular RINm5F a través de la afluencia de calcio proveniente de retículo endoplásmico

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A:

M. en B.E. MARÍA ELIZABETH MIRANDA PÉREZ

Directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dra. Clara Ortega Camarillo

Asesora:

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva

Febrero del 2017

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

**Número de registro de la beca otorgada por CONACYT y CVU del becario
248826 y 372741**

Se agradece el apoyo brindado por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, COMECYT con número de folio 12BTM0111

Se agradece el apoyo brindado a los Laboratorios Divisionales de Biología Molecular y Microscopia Confocal.

Se agradece el apoyo brindado por PROMEP-SEP con número de folio P/CA-15-2006-35-53

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "***Cucurbita ficifolia* Bouché aumenta la secreción de insulina en la línea celular RINm5F a través de la afluencia de calcio proveniente de retículo endoplásmico**", que presentó

María Elizabeth Miranda Pérez

El día 14 de Febrero del año 2017

Sinodales

Presidente

Dr. Julio César Almanza Pérez
Profesor-Investigador Titular "C".
D.C.B.S. Depto. Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.



Secretario

Dra. Rebeca García Macedo.
Investigador en Ciencias Médicas "C".
Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.



Vocal 1

Dra. Alma Delia Chávez Blanco.
Investigador en Ciencias Médicas "D".
Laboratorio 6, Epigenética y Cáncer
Instituto Nacional de Cancerología.



Vocal 2

Dra. María Del Carmen Escobar Villanueva.
Profesor investigador
D.C.B.S. Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana.



Comité tutorial

Codirector

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Lab. de Farmacología (S-348)

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

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

aaaf@xanum.uam.mx

Tel: 58 04 64 83

Codirectora

Dra. Clara Ortega Camarillo

UIM Bioquímica, Hospital de Especialidades,

CMN SXXI, IMSS

cocamarillo2014@gmail.com

Tel: 56 27 69 00 ext. 21 477

Asesora

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva.

Depto. Ciencias de la Salud D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

mcev@xanum.uam.mx

Tel: 58 04 64 83

DEDICATORIA

A mis Padres y hermanos,
que siempre me brindan su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitir la culminación de esta meta.

A **Jesús Miranda Acosta** y **Leticia Pérez Paredes** (mis padres), por enseñarme a aprovechar las oportunidades que se me presentan, siempre alentarme en cada meta y por su apoyo incondicional. A mis hermanos **Alberto** y **Luis**, que creen en mí.

A los miembros del laboratorio de Farmacología; en especial al **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**, por despertar en mí un espíritu más crítico y analítico.

A la **Dra. Clara Ortega Camarillo**, por el apoyo que siempre he recibido de ella.

A la **Dra. Ma. Del Carmen Escobar Villanueva** por su dedicación y tiempo brindado. Por guiarme en esta etapa de mi vida.

A mis amigos **Erika, Jhovan y Wendy** que siempre estuvieron ahí, que me escucharon, me brindaron su apoyo y me hicieron reír en momentos de estrés.

Resumen

Introducción

Cucurbita ficifolia Bouché (*C. ficifolia*) es una planta Mexicana de uso tradicional para el control de la diabetes tipo 2 (DT2). El efecto hipoglucémico del fruto de *C. ficifolia* ha sido demostrado en diferentes modelos de DT2 experimentales, así como en pacientes con DT2. El D-qui-ro-inositol (DQI) ha sido propuesto como el compuesto activo del fruto. Además ha sido reportado que *C. ficifolia* incrementa la expresión del RNAm de insulina y Kir 6.2 (componente del canal de K⁺ dependiente de ATP (K⁺_{ATP}), cuando es activado por una sulfonilurea) en células RINm5F. Sin embargo, aún no queda claro si *C. ficifolia* y DQI causan secreción de insulina por incremento en las concentraciones de calcio intracelular [Ca²⁺]_i, a través del bloqueo de los K⁺_{ATP}, del reservorio proveniente del retículo endoplásmico (RE) o de la actividad del receptor de incretinas. Aunado a esto, se investigó si el factor de transcripción ATF-2 está involucrado en el aumento en la expresión del RNAm de insulina.

Material y métodos

El extracto acuoso de *C. ficifolia* fue obtenido y estandarizado de acuerdo a su contenido en DQI. Las células RINm5F fueron incubadas a diferentes concentraciones (50, 100, 200 and 400 μM) de DQI o *C. ficifolia* (9, 18, 36 and 72 μg of extracto/mL), y se cuantificaron los cambios en las [Ca²⁺]_i. Las células fueron permeabilizadas con el fluorocromo (fluo 4 acetoximetil ester (Fluo 4-AM) y visualizados en el microscopio confocal. La secreción de insulina fue medida por el método de ELISA. Subsecuentemente, el efecto de *C. ficifolia* sobre los canales de K⁺_{ATP} fue evaluado. En este caso, se utilizó un activador de los canales de K⁺_{ATP}, como lo es diazóxido, para bloquear la afluencia de calcio inducida por *C. ficifolia*.

Adicionalmente, 2-amino-toxidifenil borato (2-APB) fue utilizado para inhibir la afluencia de calcio proveniente de RE, causada por *C. ficifolia*. También fue evaluado el efecto *C. ficifolia*, utilizando exendina-9 como inhibidor de la afluencia de calcio, proveniente de la actividad del receptor de incretinas. La fosforilación de ATF-2 fue medida por western blot.

Resultados

Se encontró que DQI solo no aumenta las $[Ca^{2+}]_i$ ni la secreción de insulina. Por el contrario, el tratamiento con *C. ficifolia* incrementa las $[Ca^{2+}]_i$ en 10 veces comparado con el grupo control. La secreción de insulina incrementó un 46.9 %. Además, *C. ficifolia* incrementa 2.5 la fosforilación de ATF-2 a los 60 minutos, lo que probablemente esté relacionado con el aumento en la expresión del RNAm de insulina.

En presencia de diazóxido, *C. ficifolia* disminuye las $[Ca^{2+}]_i$ en un 50 %, y la secreción de insulina es aumentada en solo un 36.4%. Por otro lado, en presencia de 2-APB, *C. ficifolia* incrementa las $[Ca^{2+}]_i$ 18 veces, indicando un efecto aditivo, la secreción de insulina se mantiene constante. Estos resultados indican que *C. ficifolia* no bloquea los canales de K^+ ATP, sin embargo, se observó efecto en las $[Ca^{2+}]_i$ provenientes de RE. En presencia de exendina-9, *C. ficifolia* incrementa 2 veces la $[Ca^{2+}]_i$, observándose baja actividad del receptor de incretinas en comparación con la actividad del receptor de RE.

Conclusiones

Las propiedades hipoglucemiantes de *C. ficifolia* pueden ser explicadas, en parte por el efecto secretagogo de insulina a través del incremento en las $[Ca^{2+}]_i$ provenientes de los reservorios del RE. Sugerimos que el mecanismo de acción de *C. ficifolia* es

diferente al de los medicamentos hasta ahora utilizados para el tratamiento de la DT2, como las sulfonilureas. Estos resultados indican que *C. ficifolia* puede ser un potente agente natural para el control de la DT2.

Summary

Introduction

Cucurbita ficifolia Bouché (*C. ficifolia*) is a plant used in Mexican traditional medicine to type 2 diabetes (T2D) control. The hypoglycemic effect of the fruit of *C. ficifolia* has been demonstrated in different experimental models and in T2D patients. It has been proposed that D-chiro-inositol (DCI) is the active compound of the fruit. Additionally, it has been reported that *C. ficifolia* increases the mRNA expression of insulin and Kir 6.2 (a component of the ATP-sensitive potassium (K^+_{ATP}) channel, which is activated by sulphonylurea) in RINm5F cells. However, it remains unclear whether *C. ficifolia* and DCI causes the secretion of insulin by increasing the concentration of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) through K^+_{ATP} channel blockage, from the reservoir in the endoplasmic reticulum (ER) or from receptor activity incretin. Besides knowing if the transcription factor ATF-2 is involved in the increase in insulin mRNA expression by the extract.

Material and methods: The aqueous extract of *C. ficifolia* was obtained and standardized with regard to its DCI content. RINm5F pancreatic β -cells were incubated with different concentrations (50, 100, 200 and 400 μ M) of DCI alone or *C. ficifolia* (9, 18, 36 and 72 μ g of extract/mL), and the $[Ca^{2+}]_i$ was quantified. The cells were preloaded with the Ca^{2+} fluorescent dye fluo4-acetoxymethyl ester (AM) and

visualized by confocal microscopy. Insulin secretion was measured by ELISA method. Subsequently, the effect of *C. ficifolia* on the K^+_{ATP} channel was evaluated. In this case, the blocker activator diazoxide was used to inhibit the *C. ficifolia*-induced calcium influx. In addition, the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-receptor-selective inhibitor 2-amino-thoxydiphenylborate (2-APB) was used to inhibit the influx of calcium from the ER that was induced by *C. ficifolia*. To evaluate the *C. ficifolia* effect on the receptor activity incretin, exendin 9-39 was used to inhibit the influx of calcium from these receptors. Moreover, the activating transcription factor ATF2 was measured by western blot.

Results: It was found that DCI alone did not increase $[Ca^{2+}]_i$ or insulin secretion. In contrast, treatment with *C. ficifolia* increased $[Ca^{2+}]_i$ 10-fold compared with the control group. Insulin secretion increased by 46.9%. In the presence of diazoxide, *C. ficifolia* decreased $[Ca^{2+}]_i$ by 50%, while insulin secretion increased by 36.4%. In contrast, in the presence of 2-APB, *C. ficifolia* increased $[Ca^{2+}]_i$ 18-fold, while insulin secretion remained constant, indicating an additive effect. Therefore, *C. ficifolia* was not found to block the K^+_{ATP} channel. However, it did exert an effect by increasing $[Ca^{2+}]_i$ from the ER, which may partly explain the insulin secretion observed following treatment with *C. ficifolia*. In presence of Exendin-9, *C. ficifolia* increased 2-fold $[Ca^{2+}]_i$, without affecting incretin receptors. Furthermore, *C. ficifolia* increased 2.5 times the activity of the transcription factor ATF-2 at 60 min.

Conclusions: The hypoglycemic properties of *C. ficifolia* can be explained in part by its effect as insulin secretagogue through an increase in $[Ca^{2+}]_i$ from ER calcium reservoir. Therefore, the mechanism of action of *C. ficifolia* is different to those of the

currently used hypoglycemic drugs, such as sulfonylureas. These results support that *C. ficifolia* may be a potential natural resource for new agents to T2D control.

ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF-2	por sus siglas en inglés: Activating Transcription Factor-2
ATP	Adenosin trifosfato
Ca²⁺	Calcio
AMP cíclico	Adenosín monofosfato-3',5'
Cdkal1	Por sus siglas en inglés: cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1
cDNA	Cadena complementaria al Ácido desoxirribonucleíco
DAG	Diacilglicerol
DGE	Dirección General de Epidemiología
DM	Diabetes mellitus
DPP4	Dipeptidil peptidasa 4
DQI	D-quiros inositol
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
FOXA2	Por sus siglas en inglés: Forkhead box a2, formerly Hepatocyte nuclear factor 3beta

GAD65	Isoforma más pequeña de glutamato descarboxilasa
GAD65Ab	Autoanticuerpos dirigidos a GAD65
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido semejante al glucagón 1
Glib	Glibenclamida
GLUT-2	Transportador de glucosa 2
GRB2	Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMGA1	Por sus siglas en inglés: Variants of <i>high-mobility group A1</i>
IDF	Federación Internacional de Diabetes
InsP3R	Receptor inositol 1,4,5-trifosfato
IP3	Inositol trifosfato
IRS1	Receptor de insulina 1
IRS2	Receptor de insulina 2
K⁺	Potasio
K⁺ATP	Canal de K ⁺ dependiente de ATP
Kir6.2	Subunidad formadora del canal de K ⁺ ATP
(LXR)-α, β	Receptores del hígado alfa y beta
MafA	Factor de transcripción v-maf fibrosarcoma músculo-homólogo del oncogén A
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCT1	Proteína transportadora de monocarboxilatos
miRNA	microRNA
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NeuroD1	Factor de diferenciación neurogénica 1
NR1H2 member 2	Por sus siglas en inglés: Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2

NR1H3 member 3	Por sus siglas en inglés: Nuclear receptor subfamily 1, group H,
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimeras
Pdx-1 homeobox-1	Por sus siglas en inglés: Factor de transcripción pancreático/duodenal
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RE	Retículo endoplásmico
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SH2	De homología al dominio 2 de la proteína Src
SNARE	Por sus siglas en inglés: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SUR1	Receptor de sulfonilurea

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	15
1.1.	Definición de la diabetes mellitus (DM)	15
1.2.	Clasificación de la Diabetes Mellitus (DM).....	15
1.3.	Prevalencia de la diabetes mellitus (DM).....	15
1.4.	Etiología de la DT2	16
1.5.	Factores transcripcionales que regulan la expresión del gen de Insulina	17
1.6.	Mecanismos de secreción de insulina y su regulación	19
1.7.	Terapéutica medicamentosa de la DM	22
1.8.	Plantas medicinales en la terapéutica de la DT2.....	25
2.	Antecedentes.....	25
3.	Justificación.....	29
4.	Pregunta de Investigación.....	30
5.	Hipótesis.....	30
6.	Objetivo general	31

6.1. Objetivos particulares	31
7. Material y métodos.....	31
7.1. Material vegetal..	31
7.2. Obtención del extracto acuoso, adquisición y cuantificación del DQI.....	31
7.3. Cultivo de células RINm5F.....	32
7.4. Ensayo de MTT	32
7.5. Ensayos de viabilidad utilizando sonda DRAQ7™	33
7.6. Evaluación de la actividad de InsP3R	34
7.7. Evaluación de la actividad del canal de K ⁺ ATP	34
7.8. Evaluación de la actividad del receptor de incretinas.....	34
7.9. Cuantificación de [Ca ²⁺] _i	35
7.10. Cuantificación de la secreción de insulina por el método de ELISA.	36
7.11. Análisis por Western Blot	36
8. Análisis estadístico.....	37
9. Resultados.....	37
9.1. Efecto sobre la viabilidad celular.....	37
9.2. Efectos sobre la secreción de insulina	38
9.3. Efecto sobre la [Ca ²⁺] _i	40
9.4. Ensayos de viabilidad utilizando sonda DRAQ7™	41
9.5. La participación de <i>C. ficifolia</i> como regulador de [Ca ²⁺] _i a través de canales de K ⁺ ATP	42
9.6. La participación de los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) en [Ca ²⁺] _i	44

9.7. La participación de los receptores de incretinas.....	48
9.8. ATF-2 fosforilación en treonina 71 (Thr 71).....	50
10. Discusión	51
11. Conclusión	57
12. Perspectivas	58
13. Referencias	58
14. Artículo científico	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de la diabetes mellitus (DM)

La DM se define como un desorden metabólico de etiología múltiple caracterizado por hiperglucemia crónica. Las alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, son resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina [1]

1.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus (DM)

El Comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), clasificó a la DM en 4 grupos [2]:

- a) **Diabetes tipo 1** (DT1). Destrucción de las células β y ausencia de insulina [3].
- b) **Diabetes tipo 2** (DT2). Resultado de un defecto progresivo en la secreción de insulina y resistencia a esta hormona.
- c) **Diabetes gestacional**. Se presenta en el embarazo y se caracteriza por resistencia a la insulina [4, 5].
- d) **Otros tipos de DM**. Debidos a defectos genéticos en la función de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino (por ejemplo, fibrosis quística), por químicos o drogas, como aquellas usadas en el tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos [6].

1.3 Prevalencia de la diabetes mellitus

Del 5 al 10% de la población mundial tiene DT1, mientras que del 85 a 90% de los casos presenta la diabetes de tipo 2 [7]. La Federación Internacional de Diabetes

(IDF) estimó en 2010 que México ocupó la décima posición entre los países con el mayor número de personas con DM (6.8 millones). Sin embargo, en los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 se reportaron 7.3 millones de casos [8]. La incidencia nacional de DT2 por año es de 404,770 [9], de los cuales 9.7% son mujeres y 8% hombres [10]. En 2009 se reportó un total que osciló entre los 6.5 y 10 millones de pacientes [11].

1.4 Etiología de la DT2

El páncreas es un órgano mixto, exocrino (segrega enzimas digestivas que pasan al intestino delgado) y endocrino (produce hormonas, como la insulina, glucagón, polipéptido pancreático y somatostatina, entre otros, que pasan a la sangre) [12]. Uno de los primeros eventos que conducen a DT2 es la resistencia a la insulina (RI), que lleva a un incremento de la síntesis y secreción de insulina [13], generalmente acompañada de obesidad [14-16] y otros factores, como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, hiperglucemia, etc., que en conjunto establecen el síndrome metabólico [17-20]. Además hay una respuesta inflamatoria, aumento del nivel de daño oxidativo del ADN por la condición de hiperglucemia y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) [21]. Los factores genéticos, también juegan un papel importante en el desarrollo de la DT2 [22, 23].

El inicio de la DT2 tiene un carácter irreversible en la mayoría de los casos. Está asociada también a defectos en las células β [24-26]. La exposición aguda de las células β a una alta concentración de glucosa estimula la expresión del gen de insulina. Sin embargo, la exposición crónica tiene diversos efectos adversos sobre la función de las células β [27]. La hiperglucemia crónica es una causa de deterioro de la biosíntesis y secreción de insulina [28]. La disminución en su masa y volumen

debido a la disfunción de la mitocondria causa estrés oxidante, así como disminución de la síntesis de ATP [29]. El incremento en la apoptosis, que no se compensa adecuadamente por la regeneración de estas células β , causa DT2 [30]. El adecuado funcionamiento del retículo endoplásmico (RE) es indispensable para la síntesis de insulina. El estrés en este organelo es un factor que contribuye a la muerte de estas células en DT2 [31, 32]. Estas alteraciones en las células β causan deficiencias de insulina, que es la base fundamental de la manifestación de la DM. De ahí la importancia de encontrar agentes que puedan provocar secreción de insulina, lo cual es fundamental para la terapéutica de la DT2 [33].

1.5 Factores transcripcionales que regulan la expresión del gen de Insulina

El gen que codifica para la insulina está localizado en el cromosoma 11p15.5. La expresión de este gen está controlada por el promotor, una región de DNA altamente conservada de 340 pb. Esta región está situada inmediatamente río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Los elementos más críticos que lo activan, son A3, C1 y E1, que se encuentran en el promotor del gen de insulina.

El factor de transcripción pancreático/duodenal homeobox-1 (PDX-1) se une al sitio A3 del promotor de insulina [34]. El factor de transcripción v-maf fibrosarcoma músculo-homólogo del oncogén A (MAFA) [35] y el factor de diferenciación neurogénica 1 (NeuroD1), también conocido como BETA2 [36, 37], tienen la capacidad para activar la transcripción del gen de insulina. Lo realizan mediante la interacción con el coactivador CBP o proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB). PDX-1, MAFA y NeuroD1 son tres factores de transcripción que actúan de una manera coordinada y sinérgica para estimular la expresión del gen de insulina en respuesta a un aumento en los niveles de glucosa [34, 38, 39].

La fosforilación de CREB, se da por un aumento de glucosa. Se ha propuesto que un aumento de $[Ca^{2+}]$ nuclear es necesario para la transcripción de CREB mediada por CRE [40, 41]. La fosforilación de CREB en el residuo Ser 133 se da por la proteína cinasa A (PKA) y es esencial para su activación. Las cinasas Ca^{2+} /calmodulina dependiente de la proteína cinasa II (CaMKII) y CaMKIV también pueden fosforilar a Ser 133 de CREB. CaMKII también puede fosforilar el segundo sitio (Ser 142) dentro del dominio de activación transcripcional de CREB. CREB fosforilado interactúa con una unidad de transcripción basal a través de la unión a los coactivadores, tales como la proteína de unión CREB (CBP) o p300 [42]. La activación del factor de transcripción-2 (ATF-2), también llamado CRE-BP1, es un miembro de la familia CREB/ATF, caracterizada por sus dominios básicos de quinción y dominios de cremallera de leucina (b-ZIP dominios). ATF-2 es fosforilado por c-Jun NH_2 terminal cinasa (JNK) y P38 activada por mitógenos (P38 MAP), en Thr 69, Thr 71 y Ser 90, que se encuentran cerca del dominio de activación transcripcional. Los factores de transcripción que se unen a este elemento regulador podrían desempeñar un papel importante en la regulación de la transcripción del gen de insulina [43, 44].

Sin duda, los diversos factores de transcripción que regulan la expresión del gen de insulina son de suma importancia. Este proyecto se enfoca en CRE-BP1, también llamado ATF-2, debido a que su actividad transcripcional se incrementa por la elevación de las concentraciones de Ca^{2+} a través de la activación de CaMKIV. La activación de ATF-2 incrementa la transcripción del gen de insulina [42, 45]. Uno de los objetivos del presente trabajo se centra en identificar un factor de transcripción que aumente la expresión del gen de insulina, debido a que el extracto acuoso de C.

ficifolia estimula la expresión de este gen. Es probable que sea un factor de transcripción relacionado con el incremento de $[Ca^{2+}]_i$.

1.6 Mecanismos de secreción de insulina y su regulación

La secreción de insulina es estimulada directamente por glucosa, secretagogos no glucosídicos (aminoácidos y lípidos), hormonas insulínótropas y neurotransmisores.

Los aminoácidos, principalmente arginina, glicina y leucina son capaces de estimular la secreción de insulina [46]. Por otro lado, la exposición prolongada a ácidos grasos libres inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa [47].

Los factores clave en el proceso de secreción de insulina son:

- El transportador de glucosa transmembranal GLUT 1 y 3 en humanos y GLUT2 en roedores.
- Canales específicos de K^+ dependientes de ATP.
- Canales de calcio dependientes de voltaje que favorecen la liberación de los gránulos de insulina.

La Figura 1 integra las vías de secreción de insulina. Cuando la concentración de glucosa aumenta entre 4-8 mM en el plasma, ésta ingresa en la célula β a través del transportador GLUT1 y GLUT3 en humanos; o GLUT 2 en roedores [7]. La glucosa se metaboliza a glucosa-6-fosfato por la glucocinasa, cuyo gen está regulado por insulina. Posteriormente el nivel intracelular de ATP aumenta como consecuencia del metabolismo de la glucosa (A en Figura 1). Los canales de K^+ se encuentran abiertos en concentraciones usuales de ATP y contribuyen de forma sustancial a mantener el potencial de membrana en reposo de las células β . Cuando el nivel de ATP aumenta, el canal de K^+ dependiente de ATP (K^+_{ATP}) de la subfamilia Kir6.2 se cierra. Por lo

tanto, la salida de este ion se ve alterada (B en Figura 1). Con este fenómeno, la membrana plasmática de la célula β se despolariza hasta alcanzar un voltaje en el que se activan los canales de calcio dependientes de voltaje (C en Figura 1). La apertura del canal permite la entrada de Ca^{2+} y desencadena la movilización y liberación de los gránulos de insulina. Además, el aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} regula una serie de eventos (D en Figura 1). Por un lado, la exocitosis de insulina mediada por segundos mensajeros dependientes de Ca^{2+} , como la fosfolipasa C (PLC) (E en la Figura 1). La PLC se encarga de hidrolizar al fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) (F). Por otro lado, el DAG activa a PKC que también puede activarse por Ca^{2+} libre en el citoplasma e induce la exocitosis de la insulina (G en la Figura 1). Por su parte, el IP_3 entra al retículo endoplásmico (RE) para liberar más Ca^{2+} al citoplasma (H en el la Figura 1). La PLC también puede activarse por un agente extracelular que se une a un receptor de superficie celular (I).

La activación del sistema parasimpático estimula la secreción de insulina y glucagón, mientras que la activación de receptores α -adrenérgicos la inhiben y los β -adrenérgicos la estimulan. Además, los neurotransmisores como acetilcolina, por lo general, potencian la secreción de insulina por una doble acción. Aumentan moderadamente la señal de disparo, es decir, aumento de calcio intracelular [Ca^{2+}]_i. La acetilcolina es secretada por el nervio vago en respuesta tanto en la anticipación de una comida como en su digestión. La acetilcolina se une a su receptor activando a una proteína G acoplada. El resultado es un cambio conformacional disociando la subunidad α de la proteína G, que estimula a la PLC, la cual hidroliza el PIP_2 (I) [48, 49]. Las hormonas como el GLP-1 y el GIP se unen a su receptor acoplado a

proteínas G, transmitiendo una señal a la adenilato ciclasa. Esta enzima genera AMP cíclico a partir de ATP. El AMP cíclico interacciona con la PKC, activándola e induciendo así la secreción de insulina. Así mismo, La activación de la PKA o PKC aumenta la eficacia de la exocitosis de insulina mediada por $[Ca^{2+}]_i$ (J en la Figura 1) [49-51].

Por último, las hormonas y los neurotransmisores inhibitorios también actúan a través de dos vías. Deprimen la secreción de insulina, en parte por la disminución de la señal de disparo (a través de la repolarización de la membrana). La reducción de la eficacia de Ca^{2+} en la exocitosis (inhibición a través de cinasas o de proteínas G) disminuye la secreción de insulina. De manera específica, la adenilato ciclasa puede ser activada o inhibida por las proteínas G que están acopladas a proteínas de membrana, dependiendo del estímulo hormonal. La somastatina (K en la Figura 1) es un ligando inhibitorio [48, 49].

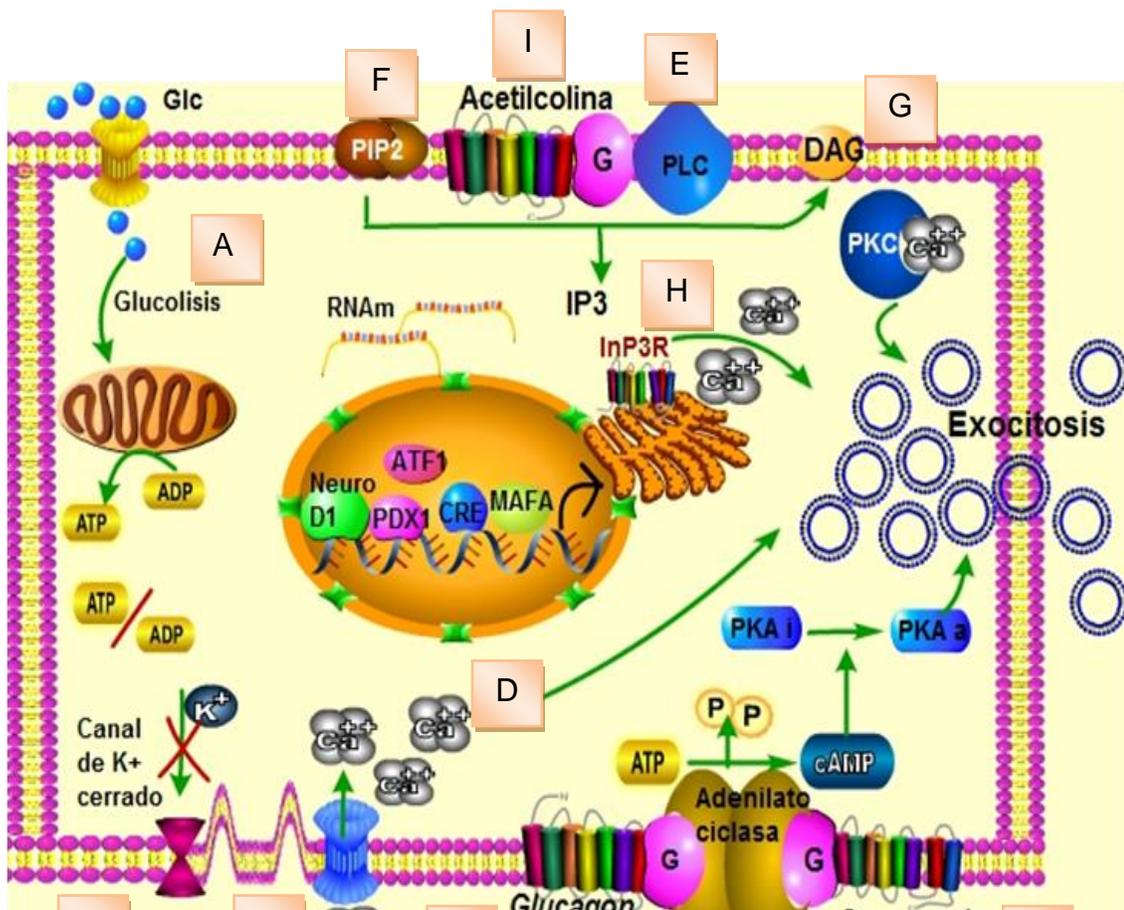


Figura 1. Representación esquemática de las vías de secreción de insulina (modificado de Yamazaki y col., 2010).

El receptor 1,4,5-trifosfato (InsP3R) se encuentran en retículo endoplásmico de células β . Es un canal de $[Ca^{2+}]_i$ que juega un papel importante en la secreción de insulina (H) ([52]. Se ha reportado que el adenofostin A, induce la secreción de insulina de manera independiente a la despolarización de membrana celular y del cierre de los canales K^{+}_{ATP} . Lo hace a través de la activación del receptor InsP3R, lo que lleva al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de la célula β , el cual proviene de los reservorios del RE [53]. El 2-aminoethoxydiphenyl borato (2-APB), un agente que impide la unión de IP3 al receptor InsP3R, disminuye la secreción de insulina [54-56]

1.7 Terapéutica medicamentosa de la DM

Según la ADA la diabetes puede ser diagnosticada con base en los criterios de glucosa plasmática, ya sea el valor de glucosa plasmática en ayunas (FPG) o el valor de glucosa plasmática de 2 horas (2 h de PG) después de un test oral de tolerancia a la glucosa de 75 g. Según los siguientes criterios de diagnóstico:

1. FPG ≥ 126 mg / dl (7,0 mmol / L). El ayuno se define como no hay ingesta calórica por lo menos 8 h.
2. 2-h PG ≥ 200 mg / dL (11,1 mmol / L) durante un OGTT.

La prueba debe realizarse según lo descrito por la OMS, utilizando una carga de glucosa que contenga el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua [57]. En este sentido, la terapéutica farmacológica de la diabetes se centra en dos objetivos íntimamente relacionados: 1) mejorar la utilización de la glucosa y otros nutrientes en los tejidos (aminoácidos, glicerol, ácidos grasos y cuerpos cetónicos) y

2) normalizar al máximo posible los niveles de glucemia sin perturbar de manera notable el estilo de vida del paciente [50].

Entre los principales hipoglucemiantes orales existentes para el tratamiento de la enfermedad se resumen en la tabla 1. Entre ellos se encuentra la pioglitazona, fármaco dirigido a reducir la RI e incrementar la actividad del receptor de insulina [58]. La metformina también es un sensibilizador de insulina usada para el tratamiento de la DT2 [59, 60]. La metformina y la fenformina se administran casi siempre en combinación con una sulfonilurea. Su mecanismo de acción incluye la inhibición de la gluconeogénesis hepática e incremento de la disponibilidad de la glucosa en músculo y tejido adiposo [61].

Los inhibidores de alfa glucosidasas, es decir, acarbosa, voglibosa y miglitol, inhiben competitivamente la absorción de los carbohidratos en el intestino delgado superior. Retrasan la digestión de los hidratos de carbono complejos y posteriormente retardan la absorción de glucosa, así como la hiperglucemia postprandial [62].

Los inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) son miembros de una clase de agentes hipoglucemiantes orales que se han introducido como una nueva opción de tratamiento de la DM2. Los Inhibidores de DPP-4 antagonizan la peptidasa de serina DPP-4. Ésta es responsable de la escisión rápida de las hormonas incretinas endógenas como el GLP-1 y el GIP *in vivo*. Después de la ingesta de alimentos, GLP-1 y GIP regulan la acción de la insulina. La secreción de glucagón también es reducida por GLP-1, que, a su vez, reduce la gluconeogénesis hepática. La prolongación de la vida media de estas incretinas aumenta la secreción de insulina dependiente de glucosa, inhibe la producción de glucosa endógena y disminuye la

glucosa en sangre [63, 64]. La exendina (9-39) es un antagonista del receptor GLP-1 que inhibe la secreción de insulina por esta vía [65].

La glibenclamida, sigue siendo un fármaco útil para aumentar la secreción de insulina [66] y, por tanto, representa una piedra angular del tratamiento farmacológico de la DT2 [67]. Induce el cierre de K^{+}_{ATP} mediante una interacción directa con el receptor del canal, llamado SUR1 ([68-70]. Las 1,2,4-tiadiazina, como el diazóxido, son conocidos como activadores de los K^{+}_{ATP} [29, 71]. En células RINm5F tratadas con diazóxido se encontró una disminución en la secreción de los gránulos de insulina [72, 73] Cuando los canales de K^{+}_{ATP} son abiertos por el diazóxido, la estimulación de la secreción de insulina por la glucosa se suprime porque la membrana de células no se despolariza y se ha propuesto que el diazóxido también impide el incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ [65, 71].

Tabla 1. Terapia medicamentosa de la enfermedad

Antidiabéticos orales	Efecto
Inhibidores de la dipeptidil-dipeptidasa 4	Actúan sobre la enzima DPP-4, anulan la acción inhibitoria que ésta tiene sobre las incretinas
Tiazolidinedionas	Promueven la producción de transportadores de glucosa
Biguanidas	Aumenta el metabolismo de la glucosa en los tejidos
Meglitinidas	Disminuyen la producción de glc hepática
Sulfonilureas	Aumentan la liberación de insulina de las células beta del páncreas

A pesar del amplio uso de estos medicamentos, se tienen reportes que más del 64% de la población mundial recurre a la medicina tradicional, como única alternativa a su alcance, para resolver sus problemas de salud [74-76].

1.8 Plantas medicinales en la terapéutica de la DT2

En nuestro país el uso de plantas medicinales es tan amplio como ancestral. El conocimiento y uso de plantas medicinales es de primordial relevancia en comunidades rurales, sobretodo indígenas. Durante siglos han preservado sus conocimientos empíricos sobre las propiedades curativas de las plantas, transmitiéndolas a lo largo de generaciones. Existen plantas que se utilizan como antiinflamatorias, anticancerígenas, antivirales, antibacteriales, antidiabéticas, antioxidantes, etc. En el caso particular de la diabetes, se tienen reportes del uso de más de 350 plantas para el control empírico de DT2 [77].

Dentro del grupo de plantas que se emplean como remedio antidiabético, destaca *Cucurbita ficifolia* Bouché (*C. ficifolia*), especie de la familia Cucurbitaceae conocida en México como “chilacayote” y que ha sido ampliamente estudiada en nuestro país. Esta planta representa una alternativa útil en el control de la DT2 al alcance de la mayoría de la población. Sin embargo, su investigación experimental y clínica en nuestro país es todavía preliminar y aún no se conocen sus mecanismos de acción hipoglucemiante.

2. Antecedentes

Se han realizado diversos estudios con *C. ficifolia*. La planta se cultiva por sus frutos comestibles. El efecto hipoglucémico del fruto de *C. ficifolia* se ha estudiado en ratas, ratones y conejos. Los estudios realizados con ratones sanos, que recibieron

diferentes dosis del jugo de *C. ficifolia* vía intraperitoneal y oral, demostraron su efecto hipoglucémico. Este efecto también se observó en ratas con aloxana y administración diaria, vía oral del jugo de *C. ficifolia* (4 ml/kg) durante 14 días [78]. Su efecto hipoglucémico también se ha valorado en pacientes con DT2 con glucemias entre 150-300 mg/dl. En estos estudios, después de la administración oral de un preparado del fruto, la glucemia se cuantificó por 5 h y se observó su disminución después de 3 h [79]. El fruto de *C. ficifolia* es comúnmente usado como un agente antidiabético, sin embargo, su mecanismo de acción es desconocido.

En otros estudios se ha demostrado que el extracto acuoso de *C. ficifolia* contiene D-quirino-inositol (DQI) al cual se le atribuyó el efecto hipoglucémico [80]. Recientemente la huella química mostró cinco compuestos mayoritarios en el extracto acuoso de *C. ficifolia*: p-cumárico (reportado con efecto antioxidante), ácido p - hidroxibenzoico, salicina (reportado con efecto antiinflamatorio), estigmast-7,2,2 - dien - 3 - ol y estigmast - 7 - en - 3 - ol [81]. En un modelo experimental de ratas diabéticas inducido por estreptozotocina, se administró por vía intragástrica, tanto el extracto del fruto de *C. ficifolia* como DQI sólo (10 y 20 mg con base en el contenido de DQI/kg de peso corporal durante 30 días). Se observó reducción de la glucemia, aumento de los niveles de glucógeno hepático, de la hemoglobina total y de la insulina plasmática [80]. Además, se demostró que *C. ficifolia* no induce el cierre de canales de K^{+}_{ATP} en tejido aislado de aorta de rata [82]. Sin embargo, en otros estudios con células RINm5F tratadas con el extracto acuoso de *C. ficifolia* durante 24 horas se observó un incremento tanto en la expresión del gen de insulina como en la disponibilidad de Ca^{2+} citoplasmático, induciendo la secreción de insulina en estas células [83].

Se ha reportado que los canales de K^{+}_{ATP} presentan variaciones en la respuesta que depende del tejido que los contenga. Por ejemplo, en las células β del páncreas el canal es activado por el diazóxido y sólo débilmente por pinacidil; por su parte, el canal de K^{+}_{ATP} cardíaco se activa por pinacidil pero no por el diazóxido. El canal del músculo liso es activado eficazmente por ambos de estos compuestos. Así, las propiedades de los canales de K^{+}_{ATP} varían entre los tejidos, lo que ha conducido a la premisa de que la familia de los canales puede estar compuesta de proteínas heterogéneas [84]. Así por ejemplo, el SUR1 es un receptor de alta afinidad para sulfonilureas que se expresa en las células β pancreáticas y el cerebro, mientras que para la subunidad SUR2 tiene una afinidad menor para estos compuestos. Existen también dos variantes principales de SUR2 debido al corte y empalme alternativo: SUR2A y SUR2B. La primera se encuentra principalmente en el corazón y el músculo esquelético, mientras que la segunda se localiza en el cerebro, corazón, hígado, músculo liso, riñón, intestino y tejido vascular. Los canales de K^{+}_{ATP} de las células β están compuestos por un tetradímero de Kir6.2 y SUR1, mientras que los canales de músculo liso, cardíaco y vascular están representados por Kir6.2-SUR2A y Kir6.1-SUR2B, respectivamente [85].

Se sabe que dos genes codifican para el canal KIR6.x y dos genes para la subunidad SUR. Las combinaciones de subunidades da lugar a subtipos de canales de K^{+}_{ATP} , que se encuentran distribuidos tanto en células β pancreáticas como en neuronas, músculo cardíaco, esquelético y liso [86, 87]. Estos datos abren la posibilidad de que el extracto acuoso de *C. ficifolia* incremente la disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$ mediante el cierre de los canales de K^{+}_{ATP} , específicos de las células β del páncreas.

Estos datos nos permiten colocar una pieza en el rompecabezas del mecanismo de acción hipoglucemiante de este extracto que, al parecer, activa al gen de insulina e incrementa el $[Ca^{2+}]_i$. Es probable que el extracto acuoso de *C. ficifolia* esté activando factores de transcripción involucrados en la activación del gen de insulina, así como aumentando la disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$, ya sea que provenga de la apertura del canal de K^+_{ATP} que se encuentra en la membrana plasmática, o por la movilización del $[Ca^{2+}]_i$, proveniente de RE. Cabe señalar que no existen reportes que indiquen que las sulfonilureas u otros agentes orales usados para el control de la diabetes aumenten la expresión génica de la insulina en las células β del páncreas. MafA, Pdx-1, NeuroD1/Beta2, IPF-1 y ATF-2 se han reportado como los factores de transcripción que se unen al promotor del gen de insulina para modular su expresión [28, 34, 36, 88] y quizá el extracto acuoso de *C. ficifolia* podría actuar a este nivel.

La señal desencadenante más importante para la maquinaria de exocitosis en las células β , en ambas fases de la secreción de insulina, es la disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$ [89], así como la señal del cierre de canales de K^+_{ATP} . La activación directa del canal K^+_{ATP} con un fármaco conocido como el diazóxido [71, 90] en las células RINm5F tratadas con extracto acuoso de *C. ficifolia*, permitiría dilucidar si el aumento en la disponibilidad del $[Ca^{2+}]_i$ que provoca este extracto es en realidad mediante el cierre del canal de K^+_{ATP} o por otro mecanismo. El receptor InsP3R, un mediador de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$, juega un papel importante en la regulación de la secreción de insulina, activa canales de Ca^{2+} que se encuentran en el RE, núcleo, gránulos secretores de insulina y en la membrana plasmática [45, 91].

Así, el receptor InsP3R es un canal de $[Ca^{2+}]_i$ que juega un papel importante en la regulación de la secreción de insulina. En islotes pancreáticos aislados de rata se

han identificado mRNA de InsP3R de los tipos I, II y III, tanto por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) como por estudios de secuenciación. El tipo III se expresa predominantemente en islotes de rata y en las células RINm5F [92, 93].

Aunque la posibilidad de que el incremento de la expresión del gen de insulina en las células RINm5F tratadas con el extracto acuoso de *C. ficifolia* [83] se deba a una acción similar al de las sulfonilureas no se descarta, también podría ser una acción similar a las producidas por las incretinas, por ejemplo GLP-1, que es una hormona activadora de la adenilato ciclasa que estimula al promotor del gen 1 de la insulina en ratas (RIP1), promoviendo su transcripción, un efecto mediado por el elemento de respuesta a AMPc (CRE) [65, 94].

Las células tumorales RINm5F son un buen modelo para evaluar la síntesis y secreción de insulina [41, 95, 96], ya que su característica principal es sintetizar y secretar insulina. Además, en dicha línea es posible identificar la activación de factores de transcripción involucrados en la expresión del gen de insulina [97].

Entre las ventajas generales de usar líneas celulares se pueden mencionar las siguientes: son modelos in vitro que permiten obtener resultados a corto plazo, los efectos de los tratamientos se verifican específicamente en un tipo particular de células (en nuestro caso de células β pancreáticas productoras de insulina) y, controlando las condiciones del medio, es posible obtener resultados confiables, homogéneos y reproducibles.

3. Justificación

La DM se asocia con una menor esperanza de vida. Las alteraciones en las células β causan deficiencias de insulina, que es la base fundamental de la manifestación de la DM. La importancia de encontrar agentes que puedan provocar síntesis y secreción

de insulina, es fundamental para la terapéutica de la DT2. Esto hace necesario trabajar en la búsqueda de nuevas sustancias o mezclas de sustancias que permitan ofrecer una alternativa eficaz para el paciente. *Cucurbita ficifolia* Bouché es una especie de la familia Cucurbitaceae ampliamente estudiada en México. Representa una alternativa útil en el control de la DT2 al alcance de la mayoría de la población, con la ventaja de ser un fruto comestible. Estudios recientes muestran que el extracto del fruto de *C. ficifolia* contiene un compuesto llamado DQI, que aparentemente es el responsable de la disminución de la hiperglucemia en animales sanos y diabéticos. En estudios in vitro se ha encontrado que esto puede ocurrir por aumento en la síntesis y secreción de insulina. Por lo tanto, es importante conocer el efecto de del extracto de *C. ficifolia* y de DQI sobre las $[Ca^{2+}]_i$ y secreción de insulina. Los resultados obtenidos ampliarán el conocimiento acerca de la acción hipoglucemiante de esta planta antidiabética, así como del DQI. Se aportará una evidencia más, a nivel molecular, de sus efectos en la diabetes. Además de tener gran potencial para el desarrollo y uso de fitomedicamentos o nuevos medicamentos, con un sustento científico apropiado, para el control de la diabetes.

4. Pregunta de investigación:

¿El aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ que provoca *C. ficifolia* ocurre debido a la actividad agonista del canal K^+_{ATP} , al receptor $InsP3R$ y/o del receptor de GLP? ¿La síntesis de insulina estimulada por *C. ficifolia* y DQI ocurre por activación del factor de transcripción ATF-2 del gen de insulina?

5. Hipótesis

La acción hipoglucemiante del extracto acuoso de *C. ficifolia* ocurre debido a un incremento en las $[Ca^{2+}]_i$, como resultado del cierre de los canales K^+_{ATP} , activación

del receptor InsP3R y/o del receptor de GLP-1, con participación del factor de transcripción ATF-2 asociado con el gen de insulina.

6. Objetivo general

Determinar si *C. ficifolia* aumenta la secreción de insulina a través de la afluencia de calcio proveniente del canal de K^+_{ATP} , del receptor InsP3R y/o del receptor de GLP-1

6.1 Objetivos particulares

- Establecer el aumento en la secreción de insulina por *C. ficifolia* mediado por la apertura de canales de K^+_{ATP} o por el receptor de GLP-1.
- Demostrar la participación del receptor InsP3R en el efecto secretagogo de la insulina inducido por el extracto de *C. ficifolia*.
- Determinar la participación de *C. ficifolia* en la fosforilación de ATF-2

7. Material y Métodos

7.1 Material vegetal

El fruto de *Cucurbita ficifolia* fue colectado en el municipio de Acolman, Estado de México en el mes de Marzo y Septiembre.

7.2 Obtención del extracto acuoso, cuantificación y adquisición del DQI

El fruto de *C. ficifolia*, sin cáscara, se cortó en rebanadas delgadas y se colocó en un recipiente para su deshidratación a temperatura ambiente y con aireación constante.

El material seco se trituró en un molino eléctrico marca Turmix, se utilizó una rejilla de 1 mm de diámetro. Este material (100 g) se sometió a una maceración con agua (1 L) por separado, durante 72 h dentro de una campana de flujo laminar. La fase acuosa se filtró y se centrifugó a 805 x g para obtener un precipitado, el cual se separó y liofilizó. El producto liofilizado fue utilizado para los experimentos

correspondientes, tal como se ha reportado en estudios previos [78, 98, 99]. La estandarización del extracto fue realizada mediante la cuantificación del contenido de DQI en el mismo extracto mediante HPLC. Para ello se usó una columna de amino con un detector de arreglo de diodos, se utilizó como vehículo CH₃CN/H₂O en una proporción 8:2. El DQI se adquirió comercialmente (Merck KGaA[®], Darmstadt, Germany).

7.3 Cultivo de células RINm5F

La línea de células productoras de insulina derivadas de un tumor de los islotes pancreáticos RINm5F fue adquirida comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC., Virginia, USA). Las células se cultivaron en monocapa usando medio RPMI 1640 (glucosa 11,1 mM) (GIBCO™ Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (ATCC., Virginia, USA), 2 mM L-glutamina, piruvato de sodio 1 mM y 2 mg/ml de gentamicina (Invitrogen of Life Technologies Corporation, Frederick, MD, USA). Las células se cultivaron a 37 °C en botellas de plástico desechables (Nunc[®] Labware & Supplies, USA) en una atmósfera humidificada de 5% de aire CO₂/95%. El medio se reemplazó dos veces por semana [97, 100, 101].

7.4 Ensayo de MTT

La funcionalidad de las células después de la aplicación de los tratamientos con *C. ficifolia* y DCI, se midió usando el reactivo (-dimetiltiazol-2-il 4,5) -2,5-dihenylnitrotetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)). Se realizó un ensayo por triplicado de acuerdo con la método de Mosmann (Mosmann, 1983). Las células RINm5F se sembraron 5.000 células/pozo en microplacas de 96 pocillos a una densidad de semiconfluencia. Después de 24 h, el medio se reemplazó con medio

que contenía extracto de *C. ficifolia* a diferentes concentraciones: 1.8, 3.6, 7.2, 18, 36, 72, 180, 360 y 720 mg de extracto/mL. Dichas concentraciones de extracto contuvieron 10, 20, 40, 100, 200, 400, 1000, 2000 y 4000 μM de DQI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectivamente. Por su parte, en los experimentos con el DQI se usaron las mismas concentraciones (10, 20, 40, 100, 200, 400, 1000, 2000 y 4000 μM de DQI). Las células se trataron durante 30 min. Posteriormente fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.4, y una solución de MTT 0.1 mg. Se añadió PBS (pH 7.5) para los lavados. Las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C, seguido de lavado con PBS. Después se añadió HCl 40 mM (200 μl) preparado en isopropanol a cada pocillo durante 15 min para solubilizar el formazán producido. La densidad óptica (DO) se leyó a 570 nm [102]. Los datos se expresaron como el porcentaje de células viables después del tratamiento con el extracto acuoso de *C. ficifolia* y DQI en comparación con las células del control.

7.5 Ensayos de viabilidad utilizando sonda DRAQ7™

Las células RINm5F fueron cultivadas en portaobjetos de vidrio de ocho pocillos Lab-Tek II. Las células tratadas se cultivaron en medio RPMI-1640 (GIBCO™ Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y antibióticos. Las células se cultivaron en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada a 37 °C y fueron tripsinizadas al 80% de confluencia usando 0.05% de EDTA tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El medio fue cambiado cada 48 h. Las células RINm5F fueron incubadas, por separado, con el extracto de *C. ficifolia* (72 mg de extracto/ml) y 400 μM de DQI durante 30 minutos. Los tratamientos fueron sustituidos por DRAQ7™ (3 μM). Las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, PBS/glicerol/DAPI (polifosfato

inorgánico 4', 6-diamidino-2-fenilindol, 1:1000) se incubó con las células para teñir el núcleo. Las células fueron montadas en un soporte de acero, la muestra se colocó en una platina del microscopio y la imagen se visualizó utilizando el microscopio confocal Zen-SP1 ZEISS de escaneo láser DRAQ7™, excitado por tanto 488 y 633-647 nm láseres [103, 104].

7.6 Evaluación de la actividad de InsP3R

Para la medir la activación del canal de InsP3R de células se incubaron con un antagonista del receptor a GLP o InsP3R (2-amino-toxidifenil borato, 2-APB., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a concentraciones de 50, 100, 150 y 200 μM durante 30 minutos) [105]. Posteriormente las células se incubaron durante 10 minutos con el extracto acuoso de *C. ficifolia* (9, 18, 36 y 72 μg de extracto/mL), que en términos de DQI correspondieron a 50, 100, 200 y 400 μM . Se determinaron las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción de insulina de estas células por el método de ELISA.

7.7 Evaluación de la actividad del canal de K^+_{ATP}

Para medir la actividad del canal de K^+_{ATP} se colocaron tratamientos con un activador del canal (diazóxido, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a concentraciones de 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 y 4000 μM durante 1 h [106]. Posteriormente estas células se incubaron durante 10 min con el extracto acuoso de *C. ficifolia* (9, 18, 36 y 72 μg de extracto/mL conteniendo 50, 100, 200 y 400 μM de DQI). Otro grupo de células se incubó con glibenclamida, un inhibidor del canal de K^+_{ATP} , a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 μM durante 10 minutos [107, 108]. Finalmente se determinaron las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción de insulina de estas células por el método de ELISA.

7.8 Evaluación de la actividad del receptor de incretinas

Para medir la actividad del receptor a GLP-1 las células se trataron con exendina-4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un agonista de este receptor (0.5, 1, 2 y 4 μM) durante 30 min (Ebinger y col., 2000; Kang y col., 2009). Otro grupo de células se incubó con exendina 9-39, un antagonista del receptor a GLP-1, a concentraciones de 0.5, 1, 2 y 4 μM durante 30 min (Ebinger y col., 2000; Skoglund y col., 2000). Posteriormente estas células se incubaron durante 10 min con el extracto acuoso de *C. ficifolia* (9, 18, 36 y 72 μg de extracto/mL conteniendo 50, 100, 200 y 400 μM de DQI, respectivamente. Se midieron las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante el microscopio confocal y la secreción de insulina de estas células por el método de ELISA.

7.9 Cuantificación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Las células RINm5F fueron cultivadas en portaobjetos de vidrio de ocho pocillos Lab-Tek II. Después de 24 h de cultivo se permeabilizaron las células durante 30 min con 1 μM del indicador de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Fluo-4 AM (Molecular Probes) en HBSS suplementado con gentamicina a 10 mg/ml y BSA al 0.1%; se lavó con el mismo medio y se dejó equilibrar. La fluorescencia se midió con una emisión de 488 nm de excitación y 535 nm usando un microscopio confocal (Zeiss Zen-Sp1) con escaneo láser. Las imágenes fueron adquiridas cada segundo con un tiempo de exposición de 20 ms por 10 min a 23 °C. El extracto acuoso de *C. ficifolia* (9, 18, 36 y 72 mg de extracto/mL y DCI solo (50, 100, 200 y 400 μM), Glibenclamida (50, 100, 200 y 400 μM) y adenofostin A (2, 4, 6 y 8 μM) se aplicaron antes de tomar 5 imágenes en cada secuencia. Los archivos de secuencias se analizaron utilizando el software ImageJ analizador de imágenes de los NIH, EE.UU. (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Las regiones de interés fueron seleccionados en el citoplasma de las células, y se midió la intensidad media de píxeles. Los cambios de fluorescencia relativa ($\Delta F/F_0$) se

representaron gráficamente como una función del tiempo y se integraron para determinar el área bajo la curva [109].

7.10 Cuantificación de la secreción de insulina por el método de ELISA

Para cuantificar la secreción de insulina por la técnica de ELISA, se colectó el medio RPMI de las células con los tratamientos correspondientes. Se midió la densidad óptica por lector de microplacas a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. La intensidad del color generado fue directamente proporcional a la cantidad de insulina en la muestra. Esta técnica de ELISA se basa en un inmunoensayo tipo sándwich, con anticuerpos monoclonales específicos para insulina, inmovilizados en la microplaca de 96 pozos en una fase sólida que contiene controles estándares (ALPCO) [110].

7.11 Análisis por Western Blot

Las células RINm5F se colectaron después de ser incubadas por 15, 30 y 60 minutos (periodo de actividad de síntesis) con el extracto acuoso de *C. ficifolia* (36 µg de extracto/mL conteniendo 200 µM de DQI). Estas células se lisaron en 1 ml de tampón de lisis celular, que contenía 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 7.4), 2 mmol/l EDTA, 100 mmol/l de NaCl, 20% glicerol (peso/volumen), y los inhibidores de la proteasa. Las proteínas se colocaron en gel SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore, Bedford, MA) mediante electrotransferencia. Las membranas se bloquearon en 5% leche baja en grasa seca disuelta en Tris-solución salina tamponada que contenía 0.1% de Tween-20 (TBS-T, pH 8.0) durante la noche a 4 °C. Después de un lavado en TBS-T, las membranas se incubaron durante 1 h a

37 °C con el anticuerpo primario (anticuerpo de rata fosfo-ATF-2 (Thr71) (Santa Cruz) se utilizó una dilución 1:1000. La detección se realizó usando el Kit ECL (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). El anticuerpo secundario fue diluido a de 1:1000. Los niveles de fosfo-ATF-2 (Thr71) se determinaron utilizando el programa NIH Imagen [42].

8. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en tres eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó el programa GraphPad Prism 5 y el nivel de significancia fue del 95%.

9. Resultados

9.1 Efecto sobre la viabilidad celular

El efecto de diferentes concentraciones de *C. ficifolia* y DQI sobre la viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT. Las células RINm5F fueron relativamente más susceptibles al extracto de *C. ficifolia* que al DQI solo. En estas células, el extracto de *C. ficifolia* a concentraciones superiores a 180 mg/ml (superiores a 1000 µM de DQI) redujo la viabilidad celular de manera dosis dependiente respecto al control, con más del 40% de reducción (Fig. 2). Por su parte, las concentraciones de DQI no mostraron diferencias significativas con respecto al control, sin mostrar evidencias de efectos citotóxicos a dichas concentraciones (Fig. 2). De acuerdo con estos datos, las concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µM de DQI solo y en el extracto se eligieron para continuar con los experimentos. La conversión de MTT a formazán insoluble por la actividad enzimática deshidrogenasa de las células se

mostró intacta en nuestros tratamientos con *C. ficifolia*. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células vivas.

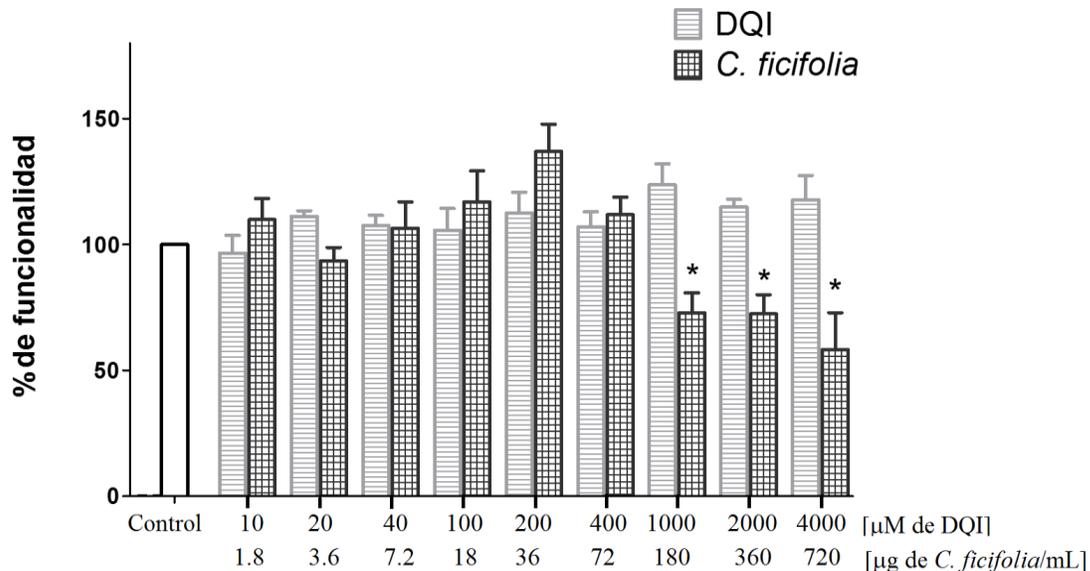


Figura 2. El efecto de diferentes concentraciones de extracto de *C. ficifolia* y DQI sobre la viabilidad de células RINm5F (ensayo de MTT, T = 1 h). El extracto acuoso de *C. ficifolia* fue estandarizado con base en el contenido de DQI. Media \pm E.E.M. (N = 4). *P<0.05 diferencia significativa con respecto al control.

9.2 Efectos sobre la secreción de insulina

El extracto de *C. ficifolia* (72 μ g/ml del extracto conteniendo 400 μ M de DQI) aumentó la secreción de insulina en 46.9%. Glibenclamida aumentó la secreción de insulina en 37%, mientras que adenofostina A lo hizo en 45% y Exendina-4 en 46%. En contraste, DQI (400 μ M), Dz y 2-APB no estimularon la secreción de insulina en las células RINm5F después de 15 min de incubación. El pretratamiento con Dz inhibió el efecto de la glibenclamida, pero no impidió el aumento de la secreción de insulina causada por *C. ficifolia*. Además, 2-APB tampoco logró inhibir el efecto de *C. ficifolia*. En contraste, la liberación de insulina observada en las células con adenofostina A

se atenuó con la presencia de 2-APB. Finalmente, la incubación de Exendina 4 estimuló y Exendina 9 inhibió la secreción de insulina; en el efecto combinado de éstos, predominó Exendina 9, que redujo de manera significativa el efecto secretagogo de Exendina-4. El pretratamiento con Exendina 9 no inhibió el efecto secretagogo de *C. ficifolia* (Fig. 3).

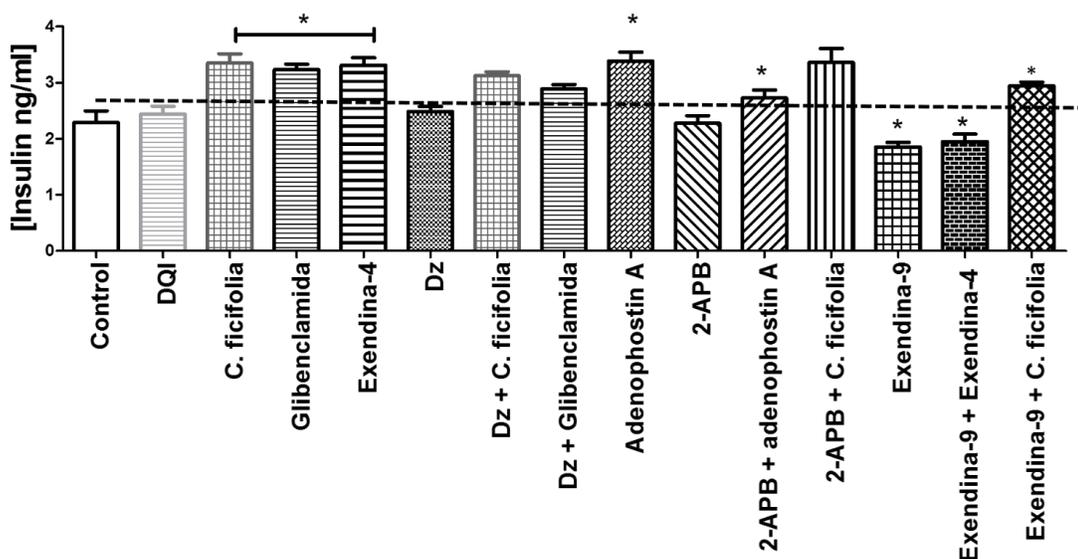


Figura 3. El efecto de diferentes tratamientos sobre la secreción de insulina en las células RINm5f. *C. ficifolia* (72 µg de extracto/mL), DQI (400 mM), diazóxido (4,000 µM, Dz), 2-APB (200 µM), adenofostin-A (8 µM), Dz (4,000 µM) + *C. ficifolia* (72 µg de extracto / mL), Dz (4,000 µM) + glibenclamida (500 µM), 2-APB (200 µM) + adenofostin-A (8 µM) y 2-APB (200 µM) + *C. ficifolia* (72 µg del extracto/mL), Exendina 4 (4 µM), Exendina 9 (4 µM). Media ± E.E.M. (N = 4). * P <0.05 comparado con el control.

9.3 Efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$

La fluorescencia normalizada de las $[Ca^{2+}]_i$ en las células RINm5F tratadas con *C. ficifolia*, DQI y glibenclamida se muestra en la Fig. 4. La barra de escala vertical

indica el aumento de la fluorescencia debido a los tratamientos. *C. ficifolia* y glibenclamida aumentaron las $[Ca^{2+}]_i$ y fueron dosis-dependiente, mientras que DQI y Dz las disminuyeron en un 50% frente al grupo control (los datos para Dz sólo fueron omitidos de la Figura 4, debido a la importancia de mostrar las diferencias entre los tratamientos: DQI y *C. ficifolia*).

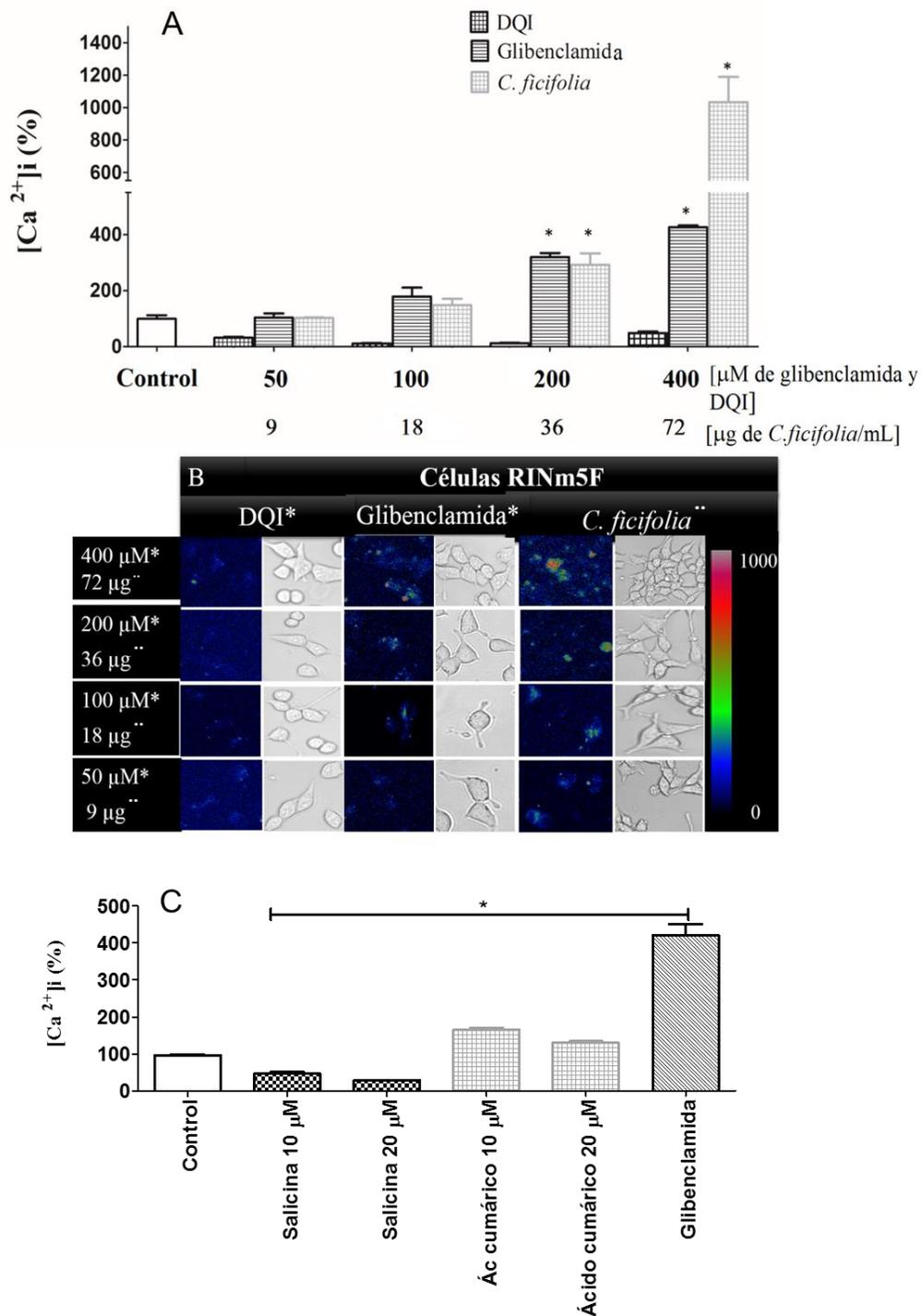


Figura 4. El efecto de *C. ficifolia*, DQI y glibenclamida en las [Ca²⁺]_i en las células RINm5F (T=10 min). (A) Fluorescencia normalizada de [Ca²⁺]_i en las células debido a los tratamientos. La barra de escala vertical indica el aumento de la fluorescencia

debido a los tratamientos. (B) Fluorescencia de las células RINm5F en el campo claro y oscuro, que muestra los cambios en la fluorescencia, mostrados en los tonos rojos, verdes y azules. (C) Fluorescencia normalizada de $[Ca^{2+}]_i$ en las células debido al tratamiento con salicina y ácido cumárico. Media \pm E.E.M. (N = 4). * $p < 0.05$ con respecto al control.

9.4 Ensayos de viabilidad utilizando sonda DRAQ7™

Debido a que existen aumentos en las $[Ca^{2+}]_i$ que podrían estar asociados con el daño celular debido a los tratamientos, fue necesario analizar la integridad de las células con el reactivo DRAQ7™, que cuantifica núcleos teñidos. Las células mostraron un 100% de viabilidad en el grupo control (Fig. 5A), así como en las células incubadas con *C. ficifolia* (Fig. 4B). Por el contrario, en las células incubadas con 40 μ M H_2O_2 , el núcleo teñido en rojo con el reactivo DRAQ7™ indicó que el 100% de las células eran inviables (Fig. 5C).

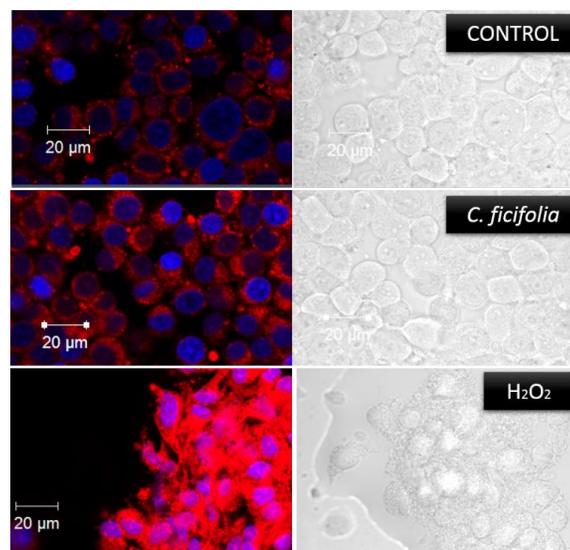


Figura 5. Ensayos de viabilidad utilizando la sonda DRAQ7™. Las células RINm5F fueron tratadas con *C. ficifolia* y H_2O_2 (aumento x 20).

9.5 La participación de *C. ficifolia* como regulador de $[Ca^{2+}]_i$ a través de canales de K^{+}_{ATP}

Las curvas concentración-respuesta se determinaron para investigar la actividad de *C. ficifolia* como regulador de la $[Ca^{2+}]_i$ a través de canales de K^{+}_{ATP} . La glibenclamida sola mostró un claro aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, en presencia de concentraciones crecientes de Dz, el efecto de la glibenclamida se inhibió gradualmente (Fig. 6A), lo que resultó en una curva típica de antagonismo competitivo. En cambio, aunque la $[Ca^{2+}]_i$ también se incrementó con *C. ficifolia*, al adicionar Dz, las $[Ca^{2+}]_i$ disminuyeron, pero en este caso las curvas se redujeron progresivamente, lo que muestra un antagonismo no competitivo, interfiriendo con la respuesta máxima (R_{max}) de *C. ficifolia* (Fig. 6B, Tabla 3). Por lo tanto, la acción de *C. ficifolia* sobre las $[Ca^{2+}]_i$ no implica el cierre de los canales de K^{+}_{ATP} , como lo hace glibenclamida. Los datos para Dz solo fueron omitidos de la Figura 6.

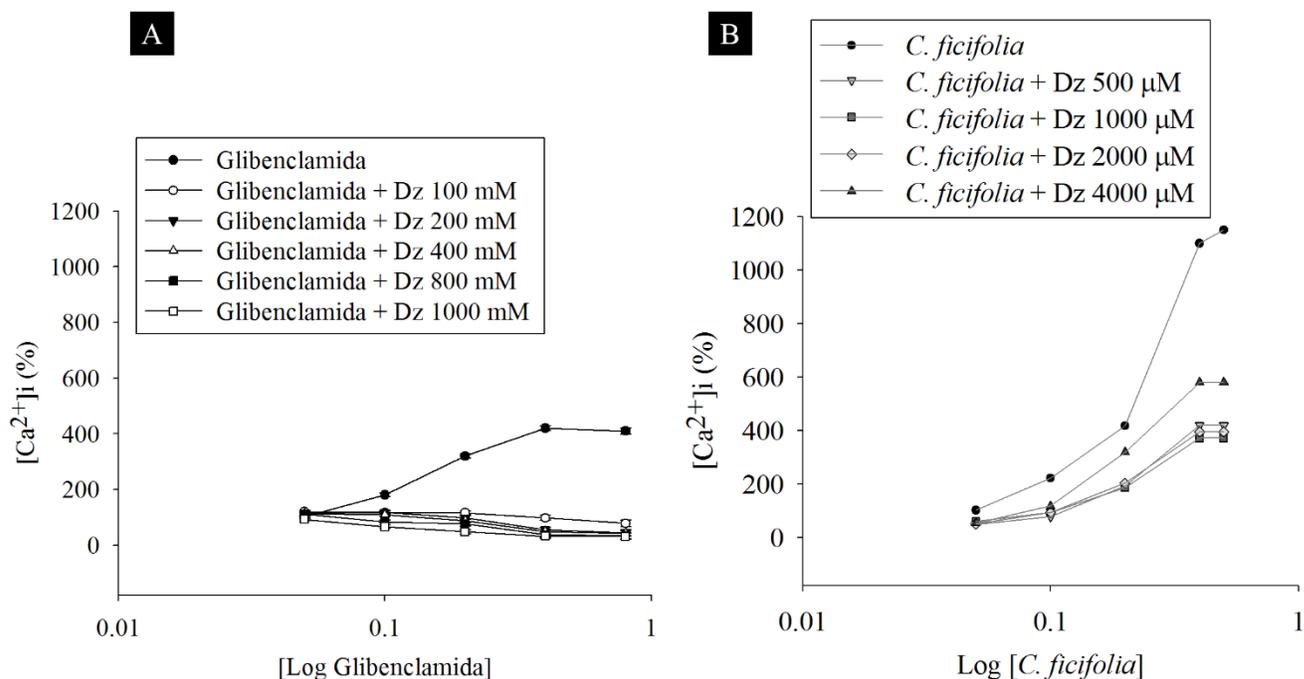


Figura 6. Efecto en las $[Ca^{2+}]_i$ por administración simultánea de diazóxido (Dz) con glibenclamida o *C. ficifolia* en células RINm5F. (A) Glibenclamida (50, 100, 200 y 400 μ M) con Dz. (B) *C. ficifolia* (9, 18, 36 y 72 mg del extracto/ml) con Dz. Media \pm E.E.M (N = 4).

Tabla 2. Respuesta máxima (R_{max}) de las $[Ca^{2+}]_i$ en las células RINm5F tratadas con glibenclamida, administración simultánea de Dz con glibenclamida o *C. ficifolia*, así como la IC_{50} con los mismos tratamientos.

Tratamiento	IC_{50}	R_{max} (%)
Glibenclamida	260.0 \pm 9.1	426.4 \pm 8.6 ^a
Glibenclamida + Dz (1000 μ M)	150.0 \pm 8.8	76.8 \pm 9.6

<i>C. ficifolia</i>	45.0±12.2	1103.6±9.8 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Dz (1000 µM)	34.2±9.1	372.0±13.3 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Dz (2000 µM)	36.0±13.1	400.0±14.1 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Dz (4000 µM)	34.2±14.1	600.0± 10.1 ^a
Diazoxido	500.0±12.5	65.0±12.9

La IC₅₀ para glibenclamida se expresa en µM; IC₅₀ para el extracto de *C. ficifolia* se expresa en µg/ml. ^a: diferencia significativa con respecto a la respuesta máxima de diazoxido (Dz), p<0.05. Media ± E.E.M (N = 4).

9.6 La participación de los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) en [Ca²⁺]_i.

Las curvas concentración-respuesta se determinaron para probar si el efecto de *C. ficifolia* implica los reservorios de Ca²⁺ del retículo endoplásmico. Estas curvas se muestran en la Figura 7. El compuesto Adenofostina A aumenta las [Ca²⁺]_i. Sin embargo, en presencia de 2-APB, este efecto fue inhibido gradualmente conforme las concentraciones de 2-APB aumentaron (Fig. 7A), resultando una curva típica de antagonismo competitivo. En contraste, *C. ficifolia* en presencia de concentraciones bajas de 2-APB, incrementa las [Ca²⁺]_i. En este caso, se observa que la R_{max} aumenta en la acción de 2-APB y *C. ficifolia* (Tabla 3). Sin embargo, a dosis altas se observó un efecto inhibitor con 2-APB, interfiriendo con la respuesta de *C. ficifolia* (Fig. 7B). En este caso, las curvas denotan dualismo competitivo para los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) con las [Ca²⁺]_i.

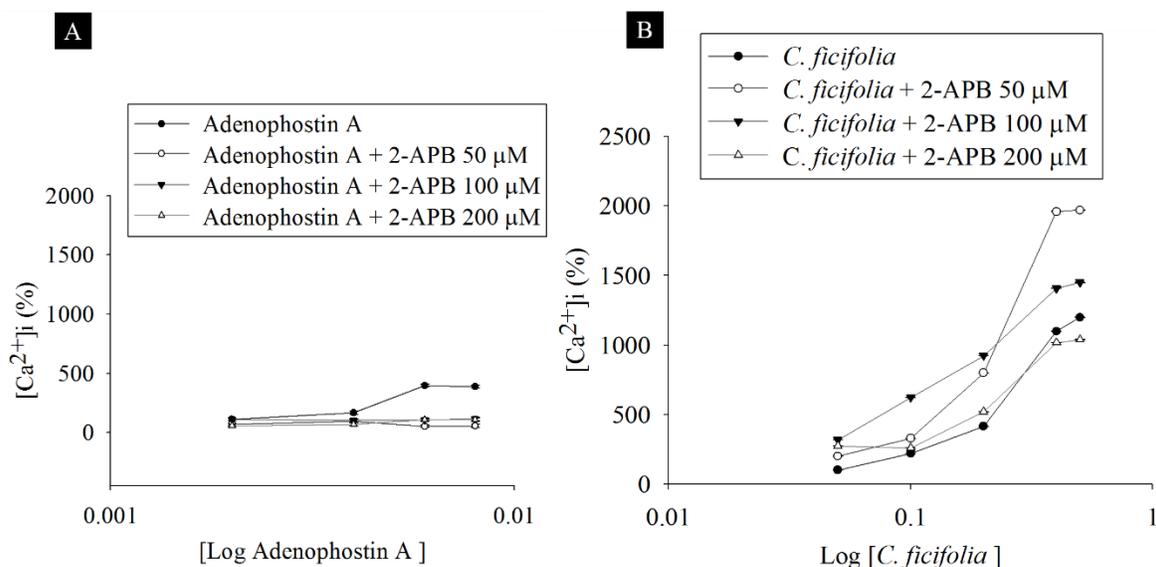


Figura 7. Efecto en las $[Ca^{2+}]_i$ por la administración simultánea de Adenophostin-A con 2-APB o *C. ficifolia* en células RINm5F. (A) Adenophostin-A (2, 4, 6 y 8 μM) con 2-APB. (B) *C. ficifolia* (9, 18, 36, 72 y 90 μg de extracto/ml) con 2-APB. $p < 0.05$, Media \pm E.E.M. (N = 4).

Tabla 3. Respuesta máxima (R_{max}) de las $[Ca^{2+}]_i$ en las células RINm5F tratadas con 2-APB, administración simultánea de 2-APB con adenophostin o *C. ficifolia*, así como la IC_{50} con los mismos tratamientos.

Tratamiento	IC_{50}	R_{max} (%)
Adenophostin	4.0 ± 0.5	396.0 ± 7.8^a
Adenophostin + 2-APB (50 μM)	5.0 ± 1.2	95.0 ± 12.9
Adenophostin + 2-APB (100 μM)	1.0 ± 0.5	114.9 ± 5.3
Adenophostin + 2-APB (200 μM)	2.0 ± 1.3	106.4 ± 25.5

<i>C. ficifolia</i>	45.0 ±12.2	1103.6±9.8 ^a
<i>C. ficifolia</i> + 2-APB (50 µM)	36.0±12.2	1663.6±11.2 ^a
<i>C. ficifolia</i> + 2-APB (100 µM)	34.2±14.1	1208.0±12.3 ^a
<i>C. ficifolia</i> + 2-APB (200 µM)	36.0±25.5	1018.0±353.9 ^a
2-APB	200.0±15.9	80.6±12.4

La IC₅₀ para glibenclamida se expresa en µM; IC₅₀ para el extracto de *C. ficifolia* se expresa en µg/ml. ^a: diferencia significativa con respecto a la respuesta máxima de 2-APB (p<0.05). Media ± E.E.M (N = 4).

El efecto aditivo de 2-APB a bajas concentraciones de *C. ficifolia* y la participación de los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) en las [Ca²⁺]_i, se observa en la Fig. 8. Se utilizaron las curvas de concentración-respuesta para determinar este efecto de 2-APB (50, 100, 150 y 200 µM) y menores concentraciones de *C. ficifolia* (4, 5, 9, 18 y 36 µg de extracto/mL) debido a inositol 1,4,5-trifosfato receptores (IP3). En particular se observó un efecto aditivo en todas las combinaciones de dosis (Fig. 8).

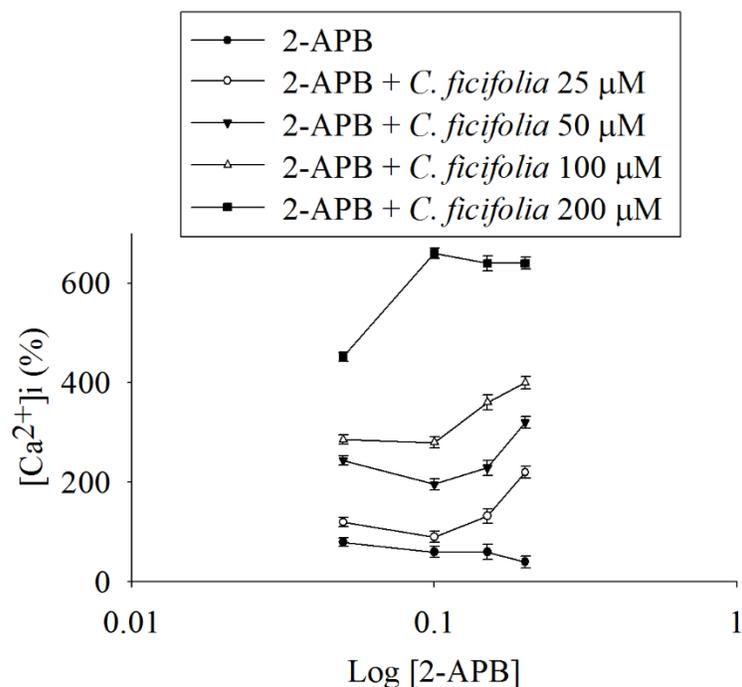


Figura 8. Efecto aditivo en las $[Ca^{2+}]_i$ por la administración simultánea de 2-APB (50, 100 y 150 μ M) con *C. ficifolia* (4.5, 9, 18 y 36 μ g del extracto/mL) en células RINm5F. $p < 0.05$ Media \pm E.E.M. (N = 4).

9.7 La participación de los receptores de incretinas

Para probar si el efecto de *C. ficifolia* implica la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ debido a la actividad de los receptores de incretinas, se realizaron las curvas concentración-respuesta que se muestran en la Figura 9. Exendina 4 aumentó las $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, en presencia de concentraciones crecientes de Exendina 9 este efecto fue inhibido gradualmente (Fig. 9A), resultando en una curva típica de antagonismo competitivo. En contraste, *C. ficifolia* en presencia de concentraciones crecientes de Exendina 9, redujo las $[Ca^{2+}]_i$. En este caso, se observa que la R_{max} aumenta en la acción de Exendina 4 y Exendina 9; por el contrario, no se observaron cambios en la acción de Exendina 9 y *C. ficifolia* (Tabla 3). Además, a la concentración más baja (0.5 μ M) se observa que existe un efecto inhibitor con Exendina 9, interfiriendo con

la respuesta máxima de *C. ficifolia* (Fig. 9B). En este caso las curvas muestran antagonismo no competitivo para los receptores de incretinas sobre las $[Ca^{2+}]_i$.

Tabla 3. Respuesta máxima (Rmax) de las $[Ca^{2+}]_i$ en las células RINm5F tratadas con exendina 9, administración simultánea de exendina-9 con exendina-4 o con *C. ficifolia*, así como la IC₅₀ con los mismos tratamientos.

Tratamiento	IC ₅₀	R _{max} (%)
Exendina 4	4±3.2	230.0±4.6 ^a
Exendina 4 + Exendina 9 (0.5 μM)	0.5± 0.6	86.0±7.8
Exendina 4 + Exendina 9 (1 μM)	0.5±1.2	94.0±18.9
Exendina 4 + Exendina 9 (2 μM)	0.5±6.5	106.9±6.3
Exendina 4 + Exendina 9 (4 μM)	4.0±4.3	98.4±21.5
<i>C. ficifolia</i>	45.0 ±12.2	1103.6±9.8 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Exendina 9 (0.5 μM)	72.0 ±12.2	526.0±11.2 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Exendina 9 (1 μM)	72.0 ±12.2	470.0±12.3 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Exendina 9 (2 μM)	72.0±12.1	616.0±353.9 ^a
Exendina 4 + Exendina 9 (4 μM)	72.0±25.5	474.0±353.9 ^a
Exendina 9	0.5±15.9	84.6±12.4

IC₅₀ para exendina 4 se expresa en μM ; IC₅₀ para el extracto de *C. ficifolia* se expresa en $\mu\text{g/ml}$. $p < 0.05$. ^a: diferencia significativa con respecto a la respuesta máxima de exendina 9, Media \pm E.E.M. (n = 4).

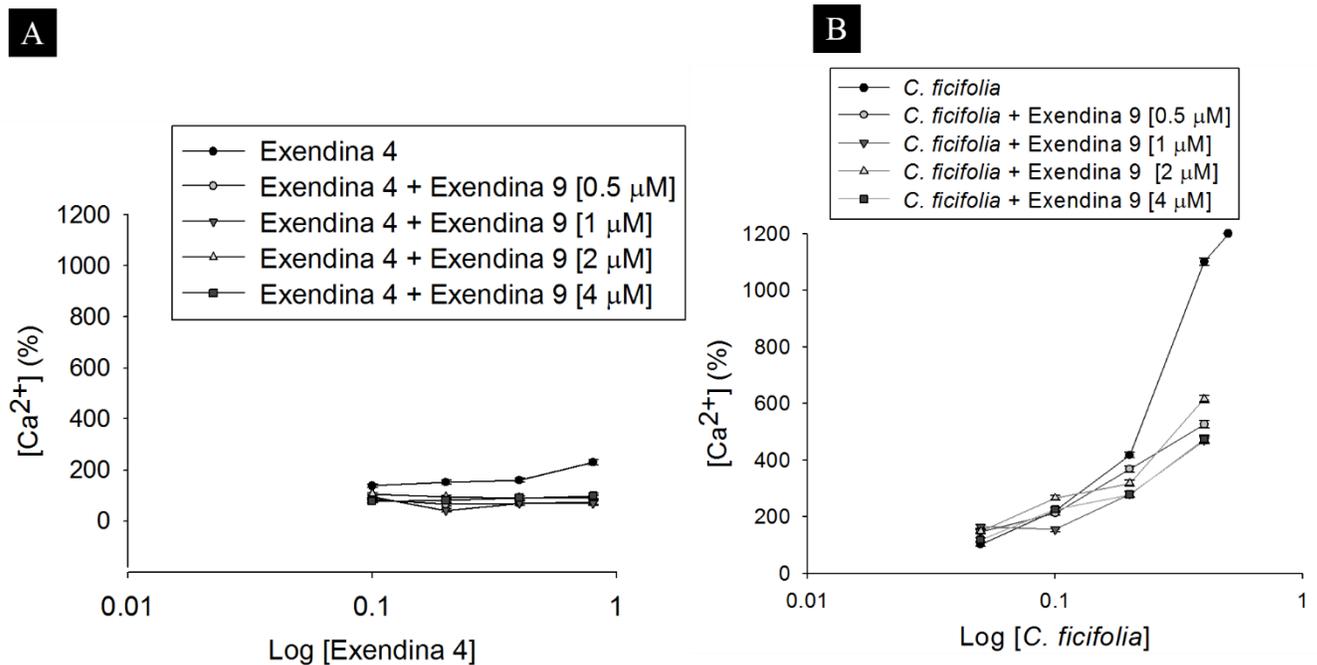


Figura 9. Efecto en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la administración simultánea de Exendina 9 con Exendina 4 o con *C. ficifolia* en las células RINm5F. (A) Exendina 4 (0.5, 1, 2 y 4 μM) con Exendina 9. (B) *C. ficifolia* (9, 18, 36 y 72 μg del extracto/ml) con Exendina 9. Media \pm E.E.M. (N = 4).

9.8 ATF-2 fosforilación en treonina 71 (Thr 71)

Para investigar la fosforilación de ATF-2 en treonina 71, las células RINm5F fueron tratadas con *C. ficifolia* (36 μg del extracto/ml) a diferentes tiempos. El análisis de western blot confirmó que el tratamiento de 60 minutos aumenta 2.5 veces más los niveles de proteína ATF-2 fosforilada en treonina 71, en comparación con el grupo control. Sin embargo, al minuto 30 y 15 los niveles de ATF-2 se comportan parecido

al grupo control. El tratamiento con Exendina 4, por 30 minutos, aumenta 1.5 veces los niveles de ATF-2 fosforilado (Figura 10).

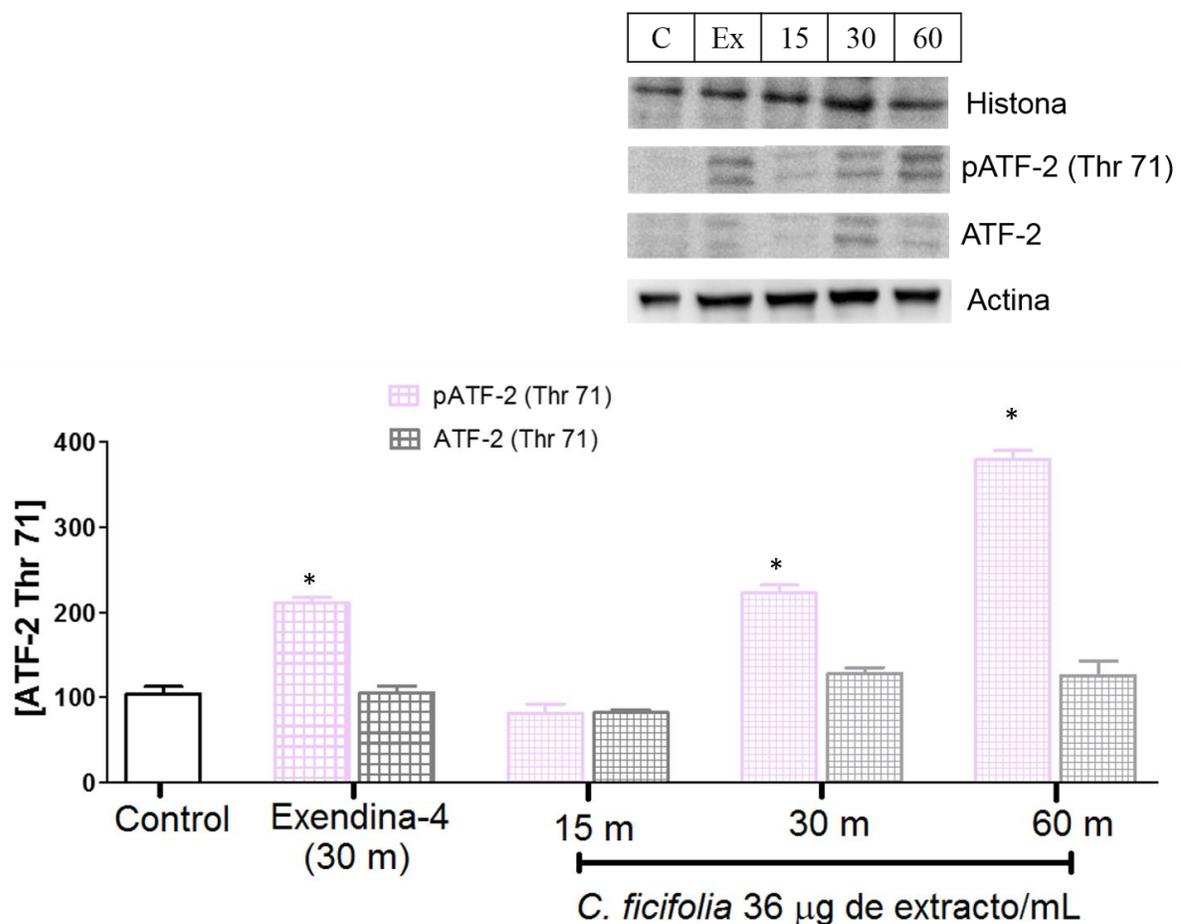


Figura 10. Efecto de la administración de *C. ficifolia* sobre la fosforilación de ATF-2. Células RINm5F fueron tratadas con Exendina 4 (Ex, 4 μ M), *C. ficifolia* (36 μ g de extracto/mL) durante 15, 30 y 60 minutos. Media \pm E.E.M. *p<0.05 con respecto al control (N = 3). C: control., Ex: exendina-4., 15 m: 15 minutos., 30 m: 30 minutos., 60 m: 60 minutos.

10. Discusión

El fruto de *Cucurbita ficifolia*, popularmente conocido como chilacayote es una planta comestible mexicana cuya actividad hipoglucemiante, antioxidante y antiinflamatoria

han sido demostradas en varias condiciones experimentales y clínicas [7]. Este estudio es una aproximación a la elucidación de los cambios moleculares que anteceden al efecto hipoglucémico de *C. ficifolia* por aumento en las $[Ca^{+2}]_i$, asociado a la secreción de insulina por diferentes vías, como es el canal de K^{+}_{ATP} , el receptor de retículo endoplásmico (RE) y el receptor de incretinas.

Recientemente el DQI se propuso como el compuesto responsable de los efectos hipoglucemiantes de los frutos de *C. ficifolia* [80]. DQI fue originalmente descubierto como un mediador de la acción intracelular de la insulina. Se ha demostrado que acelera la desfosforilación de las enzimas glucógeno sintasa y piruvato deshidrogenasa, limitando la actividad de dichas enzimas para la eliminación de la glucosa por medio de las vías oxidativa y no oxidativa [7]. La administración de DQI en ratas diabéticas, monos Rhesus y humanos aceleró la utilización de glucosa y la acción de la insulina [80]. Posteriormente estudios en nuestro laboratorio mostraron aumento significativo en la expresión del gen de insulina en las células RINm5F tratadas con DQI [83]. Este resultado sustenta la idea de que esta molécula es en parte responsable del efecto hipoglucémico del extracto acuoso de *C. ficifolia*. Sin descartar la idea de que el sinergismo entre otro tipo moléculas contenidas en este extracto sea el responsable de su efecto hipoglucémico. Sin embargo, en el presente estudio se demostró que DQI no ejerce su efecto hipoglucemiante mediante el aumento en las $[Ca^{+2}]_i$ y secreción de insulina. Por lo tanto, es probable que el efecto hipoglucémico del DQI observado en otros estudios no involucra la secreción de insulina.

En estudios previos se sugirió que *C. ficifolia* aumenta la insulina en plasma en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina [80]. Sin embargo, la participación y la

fuente de las $[Ca^{2+}]_i$ en la secreción de insulina causada por *C. ficifolia* eran inciertas. En este estudio se demostró el aumento de 1 vez las $[Ca^{2+}]_i$ para p-cumarico y 10 veces para el extracto que se asociaron con la secreción de insulina mediados por *C. ficifolia*. Sin embargo, una prueba de MTT fue requerida, debido a que este ensayo se utiliza ampliamente para estudios de citotoxicidad, viabilidad y proliferación [102]. Las células RINm5F mostraron estar intactas en los tratamientos con *C. ficifolia* [100].

En la presente investigación se determinó también la procedencia del Ca^{2+} intracelular. Es decir, si proviene del exterior celular, del RE o de la actividad del receptor de incretinas. Esto mediante el estudio de interacciones farmacológicas entre distintos fármacos agonistas y antagonistas implicados en estos procesos, ya sea implicados con el canal de K^{+}_{ATP} , con el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y/o el receptor de incretinas, administrados conjuntamente con *C. ficifolia*. Con la finalidad de asegurar la normalización y continuidad de los estudios con el extracto de *C. ficifolia*, éste fue estandarizado con base en su contenido de DQI. De esta manera, 1 g de extracto contenía 167.2 mg de DQI. Esto es especialmente importante debido a que las diferentes preparaciones de este extracto pueden contener concentraciones variables de DQI. En este sentido, cabe señalar que el mencionado contenido es el más alto en relación con los reportados previamente para otras preparaciones de *C. ficifolia* [83]. Las diferencias en el contenido de DQI podrían depender de las diferentes regiones de colecta, de la estación anual de la colecta, o del estado de madurez del fruto, como se ha reportado para otras especies frutales [111].

El extracto del fruto de *C. ficifolia* mostró un efecto citotóxico sobre las células RINm5F a 1 h de incubación y fue dependiente de la concentración. Por el contrario, DQI solo no afectó a la viabilidad celular a las concentraciones administradas (de 10 a 4000 μm). En relación con las $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las células tratadas con *C. ficifolia* y glibenclamida mostraron cambios en la fluorescencia en tonos rojos, verdes y azules, lo que indica aumento significativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que positivamente correlaciona con el aumento de las concentraciones de insulina. Sin embargo, DQI causó una reducción de más del 50% en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en todas las dosis dadas, que también se correlacionó positivamente con la ausencia de efecto sobre la secreción de insulina. Por lo tanto, DQI fue excluido de los experimentos posteriores.

En consecuencia, además de la concentración molar de DQI en el extracto, las concentraciones también se expresaron en μg de extracto/mL. Esto también es importante porque DQI no parece ser el principio activo probablemente su efecto hipoglucémico es mediante otro mecanismo. Sin embargo el extracto completo de *C. ficifolia* mostró efectos hipoglucémicos y podría ser un recurso natural potencial de nuevos agentes contra la diabetes tipo 2.

Dado que un aumento en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede desencadenar estrés del retículo endoplásmico y la muerte celular a causa de los tratamientos [112], fue necesario analizar la integridad de las células con el reactivo DRAQ7™, que cuantifica núcleos teñidos [103]. Las células incubadas con *C. ficifolia* mostraron 100% de viabilidad, similar al grupo control. Por lo tanto, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por *C. ficifolia* no representa ningún signo de daño celular pero si podría explicar el aumento en la secreción de insulina por *C. ficifolia*

El Dz, un inhibidor competitivo de la secreción de insulina inducida por glibenclamida a través de la apertura de los canales de K^{+}_{ATP} [113], no afectó la secreción de insulina causada por *C. ficifolia*. Para determinar el mecanismo de esta interacción farmacológica, se realizaron las curvas de concentración-respuesta para las $[Ca^{2+}]_i$. Las diferentes concentraciones de Dz impidieron el aumento de las $[Ca^{2+}]_i$ causados por glibenclamida debido a que ambos agentes compiten por el mismo sitio en los canales de K^{+}_{ATP} , lo que se representa en una curva típica de antagonismo competitivo [114]. Por el contrario, aunque Dz también inhibió la liberación de las $[Ca^{2+}]_i$ causado por *C. ficifolia*, la curva exhibe antagonismo no competitivo. Este resultado indica que *C. ficifolia* no bloquea los canales de K^{+}_{ATP} , lo cual es coherente con un informe previo en el que *C. ficifolia* no bloquea estos canales en la aorta torácica de rata [82].

Sin embargo, las concentraciones más altas de Dz en presencia de *C. ficifolia* aumentaron las $[Ca^{2+}]_i$. Este aumento puede ser el resultado de la activación de otras vías diferentes a los canales de potasio dependientes de ATP, que se activan como un mecanismo de compensación a la incapacidad de estos canales de mantener normales las $[Ca^{2+}]_i$ debido principalmente a las altas concentraciones de Dz. De hecho, la administración simultánea de glibenclamida y *C. ficifolia* debería resultar en un efecto sinérgico. Sin embargo, esto tiene que ser determinado en estudios posteriores. Por lo tanto, otro mecanismo que pudiera participar en la liberación de las $[Ca^{2+}]_i$ que no implique canales de K^{+}_{ATP} fue explorado, tal como el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) [49, 115].

En relación con adenosina A (un agonista del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) receptor), diferentes concentraciones de 2-APB previenen el aumento de las $[Ca^{2+}]_i$

inducido por adenofostina A, lo cual es debido a que ambos agentes compiten por el mismo sitio en el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3); la curva de dosis-respuesta correspondiente exhibió una curva típica de antagonismo competitivo (Fig 6A) [114]. Este resultado está de acuerdo con informes anteriores sobre adenofostina A y 2-APB [105, 116, 117]. Por el contrario, si bien 2-APB también inhibió la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ causado por *C. ficifolia*, esta curva exhibió dualismo competitivo aparente (Figura 6B). Esto fue confirmado claramente cuando el compuesto se incubó con *C. ficifolia* a concentraciones más bajas (Fig. 7). Estos resultados son coherentes con los informes anteriores. Dosis bajas de 2-APB no bloquearon de manera efectiva los receptores InsPR cuando se incubaron con otras moléculas de estos receptores agonistas [56, 118]. Por lo tanto, sugerimos que el 2-APB y bajas concentraciones de *C. ficifolia* tienen efectos aditivos en la inducción de las $[Ca^{2+}]_i$ en células RINm5F.

En relación con los receptores de incretinas, diferentes concentraciones de exendina 9 previenen el aumento de las $[Ca^{2+}]_i$ inducido con exendina 4, debido a que ambos agentes compiten por el mismo sitio de unión y la curva de dosis-respuesta exhibió una curva típica de antagonismo competitivo (Fig. 8A). Este resultado está de acuerdo con informes anteriores sobre exendina 4 y exendina 9 [106, 119, 120]. Por el contrario, si bien exendina 9 también inhibió la liberación de las $[Ca^{2+}]_i$ causado por *C. ficifolia*, esta curva exhibió un antagonismo no competitivo (Figura 8B).

Por último, de acuerdo con estudios previos, *C. ficifolia* aumenta la expresión del RNAm de la insulina en asociación con un aumento de la secreción de insulina [83]. Por medio de dicho efecto *C. ficifolia* puede regular la homeostasis de glucosa. La transcripción del gen de insulina está potenciada por una elevada concentración

intracelular de iones calcio, donde *C. ficifolia* tiene una participación importante, como ha sido demostrado en el presente trabajo. Uno de los elementos importantes que regulan la expresión del gen de insulina es la actividad del factor de transcripción 2 (ATF-2) que se une a los elementos sensibles a cAMP, la cual está potenciada por este aumento intracelular de iones calcio. La fosforilación en Thr 71, es requerida para que se regule la activación del gen de insulina [42]. En el presente trabajo se demostró el aumento en la fosforilación de la proteína ATF-2 (Thr 71) a los 60 minutos de la incubación, así como un aumento en las $[Ca^{2+}]_i$ en las células RINm5f tratadas con *C. ficifolia* (36 μ g de extracto/mL). Por lo tanto, este trabajo propone que los tratamientos con *C. ficifolia* aumentan la expresión del RNAm de insulina, mediante la fosforilación de ATF-2 (Thr 71). Este trabajo representa también un acercamiento a la elucidación del mecanismo de acción hipoglucemiante de *C. ficifolia*. La actividad antioxidante del ácido p-cumárico podría ayudar a reducir el estrés oxidativo y podrían contribuir al efecto hipoglucemiante del extracto mediante el aumento en las $[Ca^{2+}]_i$ asociados a la secreción de insulina.

11. Conclusión

1. Las curvas para los receptores del canal de K^+_{ATP} , así como para el de incretinas, sobre las $[Ca^{2+}]_i$, muestran antagonismo no competitivo.
2. Las propiedades hipoglucemiantes de *C. ficifolia* se pueden explicar en parte por sus efectos sobre la secreción de insulina a través de un aumento en $[Ca^{2+}]_i$ por la activación del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) en el RE.
3. El efecto secretagogo de *C. ficifolia* es diferente al de los fármacos hipoglucemiantes utilizados actualmente, tales como las sulfonilureas.

Nuestros resultados apoyan que *C. ficifolia* puede ser un recurso natural potencial para el desarrollo de nuevos agentes para el control de la DT2

12. Perspectivas

1. Corroborar los resultados en el cultivo primario
2. Determinar si alguno de los compuestos mayoritarios reportados en el fruto son los responsables de la acción sobre el receptor de retículo endoplásmico.
3. Establecer el mecanismo de la activación de este receptor.

13. REFERENCES

1. Kuzuya, T., et al., *Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2002. **55**(1): p. 65-85.
2. American Diabetes, A., (2) *Classification and diagnosis of diabetes*. Diabetes Care, 2015. **38 Suppl**: p. S8-S16.
3. Notkins, A.L., *Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 43545-8.
4. Baci, Y., et al., *Effect of maternal obesity and weight gain on gestational diabetes mellitus*. Gynecol Endocrinol, 2013. **29**(2): p. 133-6.
5. Wang, Y.H., et al., *Changes of insulin resistance and beta-cell function in women with gestational diabetes mellitus and normal pregnant women during mid- and late pregnant period: a case-control study*. J Obstet Gynaecol Res, 2013. **39**(3): p. 647-52.
6. American Diabetes, A., *Standards of medical care in diabetes--2011*. Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 1**: p. S11-61.
7. Rorsman, P. and M. Braun, *Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 155-79.
8. CA, A.-S., *La diabetes tipo 2 en México: Principales retos y posibles soluciones*. Revista de la ALAD, 2011. **4**(1): p. 148-161.
9. (DGE), D.G.d.E., *Boletín-Diabetes tipo 2 2015*: p. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol_diabetes/dm2_2015.pdf.
10. Escobedo-de la Pena, J., et al., [*Diabetes in Mexico. CARMELA study*]. Cir Cir, 2011. **79**(5): p. 424-31.
11. Diabetes, F.M.d., 2012: p. <http://www.fmdiabetes.com>.
12. Butte JM, L.O., *Páncreas divisum*. Rev. Chilena de Cirugía, 2005. **57**(2): p. 169-174.
13. Eckel, R.H., et al., *Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized?* Diabetes Care, 2011. **34**(6): p. 1424-30.
14. Barbarroja, N., et al., *Progression from high insulin resistance to type 2 diabetes does not entail additional visceral adipose tissue inflammation*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48155.
15. De Cosmo, S., et al., *Role of insulin resistance in kidney dysfunction: insights into the mechanism and epidemiological evidence*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 29-36.

16. Meyer, M.R., et al., *Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **203**(1): p. 259-69.
17. Figuerola, D., *Diabetes* Tercera edición. Ed. Masson, 1997: p. 19-25.
18. Gaddam, K.K., H.O. Ventura, and C.J. Lavie, *Metabolic syndrome and heart failure--the risk, paradox, and treatment*. Curr Hypertens Rep, 2011. **13**(2): p. 142-8.
19. Olokoba, A.B., O.A. Obateru, and L.B. Olokoba, *Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends*. Oman Med J, 2012. **27**(4): p. 269-73.
20. Povel, C.M., et al., *Metabolic syndrome model definitions predicting type 2 diabetes and cardiovascular disease*. Diabetes Care, 2013. **36**(2): p. 362-8.
21. Manoel-Caetano, F.S., et al., *Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease*. Gene, 2012. **511**(2): p. 151-60.
22. Gamboa-Melendez, M.A., et al., *Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population*. Diabetes, 2012. **61**(12): p. 3314-21.
23. Khan, A.R. and F.R. Awan, *Mining of protein based biomarkers for type 2 diabetes mellitus*. Pak J Pharm Sci, 2012. **25**(4): p. 889-901.
24. Hughes, S.D., et al., *Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(2): p. 688-92.
25. Wei, F.Y. and K. Tomizawa, *Functional loss of Cdkal1, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes*. Endocr J, 2011. **58**(10): p. 819-25.
26. Wang, J. and K. Osei, *Proinsulin maturation disorder is a contributor to the defect of subsequent conversion to insulin in beta-cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **411**(1): p. 150-5.
27. Miranda-Pérez, M.E., Alarcón-Aguilar, Francisco Jb, Ortega-Camarillo Clara, and M.D.C. Escobar-Villanueva, *Pancreatic β -Cell and Type 2 Diabetes Development*. Current Diabetes, 2016. **En prensa**.
28. Kaneto, H., et al., *Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 453892.
29. Nguyen, K.H., J.H. Lee, and B.L. Nyomba, *Ethanol causes endoplasmic reticulum stress and impairment of insulin secretion in pancreatic beta-cells*. Alcohol, 2012. **46**(1): p. 89-99.
30. Marchetti, P., et al., *The beta-cell in human type 2 diabetes*. Adv Exp Med Biol, 2010. **654**: p. 501-14.
31. Kirkpatrick, C.L., et al., *Hepatic nuclear factor 1alpha (HNF1alpha) dysfunction down-regulates X-box-binding protein 1 (XBP1) and sensitizes beta-cells to endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2011. **286**(37): p. 32300-12.
32. Bartolome, A., C. Guillen, and M. Benito, *Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic beta cell death*. Autophagy, 2012. **8**(12): p. 1757-68.
33. Ansarullah, et al., *Antioxidant rich flavonoids from Oreocnide integrifolia enhance glucose uptake and insulin secretion and protects pancreatic beta-cells from streptozotocin insult*. BMC Complement Altern Med, 2011. **11**: p. 126.
34. Ren, J., et al., *Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 1.
35. Raum, J.C., et al., *FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(15): p. 5735-43.
36. Lee, J.K., et al., *Expression of neuroD/BETA2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system*. Dev Dyn, 2000. **217**(4): p. 361-7.

37. Kaneto, H., et al., *Induction of c-Myc expression suppresses insulin gene transcription by inhibiting NeuroD/BETA2-mediated transcriptional activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): p. 12998-3006.
38. Wang, H., et al., *MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion*. Diabetologia, 2007. **50**(2): p. 348-58.
39. Andrali, S.S., et al., *Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells*. Biochem J, 2008. **415**(1): p. 1-10.
40. Muller, I., P. Lipp, and G. Thiel, *Ca²⁺ signaling and gene transcription in glucose-stimulated insulinoma cells*. Cell Calcium, 2012. **52**(2): p. 137-51.
41. Thiel, G., et al., *Egr-1-A Ca²⁺-regulated transcription factor*. Cell Calcium, 2010. **47**(5): p. 397-403.
42. Ban, N., et al., *Activating transcription factor-2 is a positive regulator in CaM kinase IV-induced human insulin gene expression*. Diabetes, 2000. **49**(7): p. 1142-8.
43. Inada, A., et al., *The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21095-103.
44. Wei, Y., et al., *Complex cis-regulatory landscape of the insulin receptor gene underlies the broad expression of a central signaling regulator*. Development, 2016. **143**(19): p. 3591-3603.
45. Lee, H.Y., et al., *Muscle-specific activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV increases whole-body insulin action in mice*. Diabetologia, 2014. **57**(6): p. 1232-41.
46. Montoya E, T.N., *Tratado SED de Diabetes Mellitus. Bases moleculares, clínica y tratamiento*. Editorial Médica Panamericana, 2007(Madrid, España): p. 111-122.
47. Juhl, C., et al., *Effects of fasting on physiologically pulsatile insulin release in healthy humans*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S255-7.
48. Henquin, J.C., *Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S48-58.
49. Yamazaki, H., K.C. Zawalich, and W.S. Zawalich, *Physiologic implications of phosphoinositides and phospholipase C in the regulation of insulin secretion*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2010. **56**(1): p. 1-8.
50. Gagliardino, J.J., *Physiological endocrine control of energy homeostasis and postprandial blood glucose levels*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2005. **9**(2): p. 75-92.
51. Itoh, Y., et al., *Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 173-6.
52. Lee, K.S., et al., *Autonomic regulation of insulin secretion is changed by pentobarbital in mice*. Neurosci Lett, 2010. **479**(1): p. 6-9.
53. Rosenberg, H.J., et al., *Synthesis and Ca²⁺-mobilizing activity of purine-modified mimics of adenophostin A: a model for the adenophostin-Ins(1,4,5)P₃ receptor interaction*. J Med Chem, 2003. **46**(23): p. 4860-71.
54. Dong, H., et al., *Molecular mechanisms underlying Ca²⁺-mediated motility of human pancreatic duct cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(6): p. C1493-503.
55. Nakagawa, Y., et al., *Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5106.
56. Choi, K.J., et al., *Caffeine and 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) Have Different Ability to Inhibit Intracellular Calcium Mobilization in Pancreatic Acinar Cell*. Korean J Physiol Pharmacol, 2010. **14**(2): p. 105-11.
57. American Diabetes, A., 2. *Classification and Diagnosis of Diabetes*. Diabetes Care, 2017. **40**(Suppl 1): p. S11-S24.

58. Han, S.J., et al., *Effects of pioglitazone on subclinical atherosclerosis and insulin resistance in nondiabetic renal allograft recipients*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(3): p. 976-84.
59. Naka, K.K., et al., *Effects of pioglitazone and metformin on vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes treated with sulfonylureas*. Diab Vasc Dis Res, 2012. **9**(1): p. 52-8.
60. Nakatani, K., et al., *Drug-induced generalized skin eruption in a diabetes mellitus patient receiving a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor plus metformin*. Diabetes Ther, 2012. **3**(1): p. 14.
61. Martin, G.M., et al., *Pharmacological Correction of Trafficking Defects in ATP-sensitive Potassium Channels Caused by Sulfonylurea Receptor 1 Mutations*. J Biol Chem, 2016. **291**(42): p. 21971-21983.
62. Standl, E. and O. Schnell, *Alpha-glucosidase inhibitors 2012 - cardiovascular considerations and trial evaluation*. Diab Vasc Dis Res, 2012. **9**(3): p. 163-9.
63. Hoimark, L., T. Laursen, and J. Rungby, *Potential role of linagliptin as an oral once-daily treatment for patients with type 2 diabetes*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2012. **5**: p. 295-302.
64. Russell-Jones, D. and S. Gough, *Recent advances in incretin-based therapies*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **77**(4): p. 489-99.
65. Skoglund, G., M.A. Hussain, and G.G. Holz, *Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element*. Diabetes, 2000. **49**(7): p. 1156-64.
66. Rambiritch, V., P. Naidoo, and G. Pillai, *Glibenclamide population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in South African type 2 diabetic subjects*. Clin Pharmacol, 2016. **8**: p. 141-153.
67. Proks, P., et al., *Sulfonylurea stimulation of insulin secretion*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S368-76.
68. Abdallah, D.M., N.N. Nassar, and R.M. Abd-El-Salam, *Glibenclamide ameliorates ischemia-reperfusion injury via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus*. Brain Res, 2011. **1385**: p. 257-62.
69. Wang, Q., et al., *Interaction of glibenclamide and metformin at the level of translation in pancreatic beta cells*. J Endocrinol, 2011. **208**(2): p. 161-9.
70. Willenborg, M., et al., *Studies of first phase insulin secretion using imposed plasma membrane depolarization*. Front Biosci (Schol Ed), 2011. **3**: p. 662-79.
71. Dabrowski, M., et al., *Potent and selective activation of the pancreatic beta-cell type K(ATP) channel by two novel diazoxide analogues*. Diabetologia, 2003. **46**(10): p. 1375-82.
72. Gribble, F.M., S.J. Tucker, and F.M. Ashcroft, *The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide*. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1145-52.
73. Henquin, J.C., et al., *In vitro insulin secretion by pancreatic tissue from infants with diazoxide-resistant congenital hyperinsulinism deviates from model predictions*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3932-42.
74. Akram, M., et al., *Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2014. **27**(3): p. 313-9.
75. Marles, R.J. and N.R. Farnsworth, *Antidiabetic plants and their active constituents*. Phytomedicine, 1995. **2**(2): p. 137-89.
76. Balogun, F.O., N.T. Tshabalala, and A.O. Ashafa, *Antidiabetic Medicinal Plants Used by the Basotho Tribe of Eastern Free State: A Review*. J Diabetes Res, 2016. **2016**: p. 4602820.

77. Romero CO, R.M., Aguilar SL, Huerta RM, Tortoriello GJ, *Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico*. BLACPMA, 2009. **5**(380): p. 380-388.
78. Alarcon-Aguilar, F.J., et al., *Evaluation of the hypoglycemic effect of Cucurbita ficifolia Bouche (Cucurbitaceae) in different experimental models*. J Ethnopharmacol, 2002. **82**(2-3): p. 185-9.
79. Acosta, I., et al., *Prevalence of diabetes mellitus among pregnant women receiving health services at the Puerto Rico University Hospital, Puerto Rico, 1997-1998*. P R Health Sci J, 2001. **20**(2): p. 165-70.
80. Xia, T. and Q. Wang, *D-chiro-inositol found in Cucurbita ficifolia (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats*. J Pharm Pharmacol, 2006. **58**(11): p. 1527-32.
81. Garcia Gonzalez Jessica, G.L.M., Zamilpa Alejandro, Almanza Perez Julio, and Jasso Villagomez E. Ivan Cesar, Roman Ramos Ruben, Alarcon-Aguilar Francisco Javier, *Chemical characterization of a hypoglycemic extract from Cucurbita ficifolia Bouche that induces liver glycogen accumulation in diabetic mice*. Afr J Tradit Complement Altern Med., 2017. **3**(14): p. En prensa.
82. Banderas-Dorantes TR, R.-R.R., Zamilpa A, García-Macedo R, Campos MG, Tortoriello J, Alarcon-Aguilar FJ. in rat aortic rings. , *"Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (Cucurbita ficifolia Bouché and Ibervillea sonora Greene) on ATP-sensitive potassium channels* BLACPMA 2012. **6** (11): p. 510-5119.
83. Miranda-Pérez ME, E.-V.M., Ortega-Camarillo C, Sánchez-Muñoz F, Almanza-Pérez JC, Alarcón-Aguilar FJ, *Cucurbita ficifolia Bouché fruit acts as an insulin secretagogue in RINm5F cells*. Int. Biotech. Color J. , 2013. **3**(1): p. 8-14.
84. Isomoto, S., et al., *A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel*. J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24321-4.
85. Szamosfalvi, B., et al., *Putative subunits of the rat mesangial KATP: a type 2B sulfonylurea receptor and an inwardly rectifying K⁺ channel*. Kidney Int, 2002. **61**(5): p. 1739-49.
86. Babenko, A.P., L. Aguilar-Bryan, and J. Bryan, *A view of sur/KIR6.X, KATP channels*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 667-87.
87. Principalli, M.A., et al., *Kir6.2 activation by sulfonylurea receptors: a different mechanism of action for SUR1 and SUR2A subunits via the same residues*. Physiol Rep, 2015. **3**(9).
88. Ganic, E., et al., *MafA-Controlled Nicotinic Receptor Expression Is Essential for Insulin Secretion and Is Impaired in Patients with Type 2 Diabetes*. Cell Rep, 2016. **14**(8): p. 1991-2002.
89. Gao, N., et al., *Foxa2 controls vesicle docking and insulin secretion in mature Beta cells*. Cell Metab, 2007. **6**(4): p. 267-79.
90. Hong, S.H., et al., *Regulation of myometrial contraction by ATP-sensitive potassium (KATP) channel via activation of SUR2B and Kir 6.2 in mouse*. J Vet Med Sci, 2016. **78**(7): p. 1153-9.
91. Lingvay, I., et al., *Effect of insulin versus triple oral therapy on the progression of hepatic steatosis in type 2 diabetes*. J Investig Med, 2012. **60**(7): p. 1059-63.
92. Takeda, Y., et al., *Modeling analysis of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated Ca²⁺ mobilization under the control of glucagon-like peptide-1 in mouse pancreatic beta-cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **310**(5): p. C337-47.
93. Lee, B., P.G. Bradford, and S.G. Laychock, *Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform mRNA expression and regulation in rat pancreatic islets, RINm5F cells and betaHC9 cells*. J Mol Endocrinol, 1998. **21**(1): p. 31-9.

94. Kolic, J. and P.E. MacDonald, *cAMP-independent effects of GLP-1 on beta cells*. J Clin Invest, 2015. **125**(12): p. 4327-30.
95. Baltrusch, S., et al., *Improved metabolic stimulus for glucose-induced insulin secretion through GK and PFK-2/FBPase-2 coexpression in insulin-producing RINm5F cells*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5768-76.
96. Song, M.Y., et al., *Nardostachys jatamansi extract protects against cytokine-induced beta-cell damage and streptozotocin-induced diabetes*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(26): p. 3249-57.
97. Chen, Z., et al., *Transcription factors E2A, FOXO1 and FOXP1 regulate recombination activating gene expression in cancer cells*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20475.
98. Contreras-Weber, C., et al., *Anti-hyperglycemic effect of Psacalium peltatum*. Proc West Pharmacol Soc, 2002. **45**: p. 134-6.
99. Hernandez-Galicia, E., et al., *Monoglycerides and fatty acids from Ibervillea sonorae root: isolation and hypoglycemic activity*. Planta Med, 2007. **73**(3): p. 236-40.
100. Lim, S., et al., *Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic beta-cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(5): p. 873-86.
101. Barzalobre-Geronimo, R., et al., *Erratum to: Hyperglycemia promotes p53-Mdm2 interaction but reduces p53 ubiquitination in RINm5F cells*. Mol Cell Biochem, 2015. **406**(1-2): p. 301.
102. Tolosa, L., M.T. Donato, and M.J. Gomez-Lechon, *General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay*. Methods Mol Biol, 2015. **1250**: p. 333-48.
103. Wlodkowic, D., et al., *Kinetic viability assays using DRAQ7 probe*. Curr Protoc Cytom, 2013. **Chapter 9**: p. Unit 9 41.
104. Akagi, J., et al., *Real-time cell viability assays using a new anthracycline derivative DRAQ7(R)*. Cytometry A, 2013. **83**(2): p. 227-34.
105. Jarrard, R.E., et al., *Potentiation of sulfonylurea action by an EPAC-selective cAMP analog in INS-1 cells: comparison of tolbutamide and gliclazide and a potential role for EPAC activation of a 2-APB-sensitive Ca²⁺ influx*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(1): p. 191-205.
106. Kong, M. and M. Ba, *Protective effects of diazoxide against Abeta(2)(5)(-)(3)(5)-induced PC12 cell apoptosis due to prevention of endoplasmic reticulum stress*. Neuroreport, 2012. **23**(8): p. 493-7.
107. Qian, X., et al., *Glibenclamide exerts an antitumor activity through reactive oxygen species-c-jun NH2-terminal kinase pathway in human gastric cancer cell line MGC-803*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(12): p. 1705-15.
108. Wang, Q., et al., *Glibenclamide activates translation in rat pancreatic beta cells through calcium-dependent mTOR, PKA and MEK signalling pathways*. Diabetologia, 2008. **51**(7): p. 1202-12.
109. Diaz-Garcia, C.M., et al., *Low molecular weight compounds from Zoanthus sociatus impair insulin secretion via Ca(+2) influx blockade and cause glucose intolerance in vivo*. Toxicon, 2012. **59**(2): p. 306-14.
110. Lei, L.T., et al., *Resveratrol attenuates senescence of adipose-derived mesenchymal stem cells and restores their paracrine effects on promoting insulin secretion of INS-1 cells through Pim-1*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016. **20**(6): p. 1203-13.
111. Buenz, E.J., et al., *A randomized Phase I study of Atuna racemosa: a potential new anti-MRSA natural product extract*. J Ethnopharmacol, 2007. **114**(3): p. 371-6.
112. Wei, H., *The role of calcium dysregulation in anesthetic-mediated neurotoxicity*. Anesth Analg, 2011. **113**(5): p. 972-4.
113. Wang, Y., et al., *Diazoxide, a K(ATP) channel opener, prevents ischemia-reperfusion injury in rodent pancreatic islets*. Cell Transplant, 2015. **24**(1): p. 25-36.

114. Gopalakrishnan, M., et al., *Pharmacology of human sulphonylurea receptor SUR1 and inward rectifier K(+) channel Kir6.2 combination expressed in HEK-293 cells*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(7): p. 1323-32.
115. Sabourin, J., et al., *Store-operated Ca²⁺ Entry Mediated by Orai1 and TRPC1 Participates to Insulin Secretion in Rat beta-Cells*. J Biol Chem, 2015. **290**(51): p. 30530-9.
116. Ding, Z., et al., *Binding of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and adenophostin A to the N-terminal region of the IP3 receptor: thermodynamic analysis using fluorescence polarization with a novel IP3 receptor ligand*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(6): p. 995-1004.
117. Bootman, M.D., et al., *2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca²⁺ release*. FASEB J, 2002. **16**(10): p. 1145-50.
118. Peppiatt, C.M., et al., *2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels*. Cell Calcium, 2003. **34**(1): p. 97-108.
119. Kang, J.H., et al., *Exendin-4 inhibits interleukin-1beta-induced iNOS expression at the protein level, but not at the transcriptional and posttranscriptional levels, in RINm5F beta-cells*. J Endocrinol, 2009. **202**(1): p. 65-75.
120. Nauck, M.A., et al., *Quantification of the Contribution of GLP-1 to Mediating Insulinotropic Effects of DPP-4 Inhibition With Vildagliptin in Healthy Subjects and Patients With Type 2 Diabetes Using Exendin [9-39] as a GLP-1 Receptor Antagonist*. Diabetes, 2016. **65**(8): p. 2440-7.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Cucurbita ficifolia Bouché increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum



Maria Elizabeth Miranda-Perez^{a,*}, Clara Ortega-Camarillo^b,
 Maria Del Carmen Escobar-Villanueva^c, Gerardo Blancas-Flores^c,
 Francisco Javier Alarcon-Aguilar^{c,*}

^a División de Ciencia Biológicas y de la Salud (DCBS), Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I), Avenida San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México, México

^b Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, HE, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtemoc 330, Col. Doctores, Del. Cuauhtemoc, Ciudad de México, México

^c Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I, Avenida San Rafael Atlixco 186, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 29 December 2015
 Received in revised form
 15 April 2016
 Accepted 28 April 2016
 Available online 9 May 2016

Keywords:
Cucurbita ficifolia
 Type 2 diabetes
 ATP-dependent potassium channel
 Intracellular calcium
 Endoplasmic reticulum
 Insulin secretion

ABSTRACT

Ethnopharmacological importance: *Cucurbita ficifolia* Bouché (*C. ficifolia*) is a plant used in Mexican traditional medicine to control type 2 diabetes (T2D). The hypoglycemic effect of the fruit of *C. ficifolia* has been demonstrated in different experimental models and in T2D patients. It has been proposed that D-chiro-inositol (DCI) is the active compound of the fruit. Additionally, it has been reported that *C. ficifolia* increases the mRNA expression of insulin and Kir 6.2 (a component of the ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel, which is activated by sulphonylurea) in RINm5F cells. However, it remains unclear whether *C. ficifolia* and DCI causes the secretion of insulin by increasing the concentration of intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) through K_{ATP} channel blockage or from the reservoir in the endoplasmic reticulum (ER). **Material and methods:** The aqueous extract of *C. ficifolia* was obtained and standardized with regard to its DCI content. RINm5F pancreatic β -cells were incubated with different concentrations (50, 100, 200 and 400 μM) of DCI alone or *C. ficifolia* (9, 18, 36 and 72 μg of extract/mL), and the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the cells was quantified. The cells were preloaded with the Ca^{2+} fluorescent dye fluo4-acetoxymethyl ester (AM) and visualized by confocal microscopy. Insulin secretion was measured by an ELISA method. Subsequently, the effect of *C. ficifolia* on the K_{ATP} channel was evaluated. In this case, the blocker activator diazoxide was used to inhibit the *C. ficifolia*-induced calcium influx. In addition, the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-receptor-selective inhibitor 2-amino-thoxydiphenylborate (2-APB) was used to inhibit the influx of calcium from the ER that was induced by *C. ficifolia*.

Results: It was found that DCI alone did not increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ or insulin secretion. In contrast, treatment with *C. ficifolia* increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 10-fold compared with the control group. Insulin secretion increased by 46.9%. In the presence of diazoxide, *C. ficifolia* decreased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by 50%, while insulin secretion increased by 36.4%. In contrast, in the presence of 2-APB, *C. ficifolia* increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 18-fold, while insulin secretion remained constant, indicating an additive effect. Therefore, *C. ficifolia* was not found to block the K_{ATP} channel. However, it did exert an effect by increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from the ER, which may partly explain the insulin secretion observed following treatment with *C. ficifolia*.

Conclusions: The hypoglycemic properties of *C. ficifolia* can be explained in part by its effect as a secretagogue for insulin through an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from the calcium reservoir in the ER. Therefore, the mechanism of action of *C. ficifolia* is different to those of the currently used hypoglycemic drugs, such as sulphonylureas. These results support that *C. ficifolia* may be a potential natural resource for new agents to control T2D.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: 2-APB, Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-receptor-selective inhibitor 2-amino-ethoxydiphenylborate; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Concentration of intracellular calcium; *C. ficifolia*, *Cucurbita ficifolia* Bouché; DCI, D-chiro-inositol; Dz, Diazoxide; ER, Endoplasmic reticulum; Fluo 4AM, Fluorescent dye fluo4-acetoxymethyl ester (AM); IP3Rs, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors; K_{ATP} , ATP-dependent potassium channel; Kir6.2, A component of the K_{ATP} channel activated by sulphonylurea; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-dihenzotetrazolium bromide; T2D, Type 2 diabetes

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mirandapme@hotmail.com (M.E. Miranda-Perez), cocamarillo2014@gmail.com (C. Ortega-Camarillo), macaresvi@yahoo.com.mx (M. Del Carmen Escobar-Villanueva), gera_1024@yahoo.com.mx (G. Blancas-Flores), aaaf@xanum.uam.mx (F.J. Alarcon-Aguilar).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.061>

0378-8741/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Medicinal plants have attracted attention because they contain important sources of new molecules that are secretagogues of insulin for the treatment of type 2 diabetes (T2D) (Chang et al., 2013; Hussain et al., 2004; Keller et al., 2011). *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) is cultivated in Mexico for its edible fruit, which is commonly known as “chilacayote” (Seshadri and More, 2009). *C. ficifolia* fruit is also medicinally used to control T2D, and in addition to its hypoglycemic activity, it has shown antioxidant and anti-inflammatory properties (Díaz-Flores et al., 2012; Fortis-Barrera et al., 2013; Roman Ramos et al., 1992, 2012). Its hypoglycemic activity has been demonstrated in different experimental models and in T2D patients (Alarcon-Aguilar et al., 2002; Acosta-Patino et al., 2001). Xia and Wang (2006a) reported that the *C. ficifolia* fruit increases plasma insulin in streptozotocin-induced diabetic rats (Xia and Wang, 2006). In addition, D-chiro-inositol (DCI) has been proposed as the active compound in *C. ficifolia* (Xia and Wang 2006b).

In addition, it was demonstrated that *C. ficifolia* has no effect on the ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}^+) in the aorta of rat. However, in RINm5F cells (an insulin-secreting cell line), *C. ficifolia* increased the mRNA expression of insulin and Kir6.2 (a component of the K_{ATP}^+ channel activated by sulphonylurea). This increase allows us to hypothesize that *C. ficifolia* may cause an effect on the K_{ATP}^+ channel in insulin-secreting cells. Changes in the free cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) play a crucial role in the control of insulin secretion. The K_{ATP}^+ channel and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) are key components of insulin secretion, and both are important sources of $[Ca^{2+}]_i$ in the cytosol or in the endoplasmic reticulum (ER), respectively (Clark and Proks, 2010; Dufer et al., 2007; Rorsman and Braun, 2013; Szollosi et al., 2007; Tanaka et al., 2014). However, it is unclear whether the secretion of insulin by *C. ficifolia* involves $[Ca^{2+}]_i$ and if this influx is provided extracellularly or from the ER. The aim of this study was to determine if the secretion of insulin by *C. ficifolia* and DCI occur through modifications in $[Ca^{2+}]_i$ because the closing of the K_{ATP}^+ channel and/or by the action of the ER.

2. Material and methods

2.1. Plant

C. ficifolia fruit was collected in Acolman, State of Mexico. Botanical identification was certified by an expert in Ethnobotanics from the Medicinal Plant Herbarium of the Mexican Institute of Social Security (IMSS-M-Herbarium) at Mexico City, voucher specimen num. 11119 (Díaz-Flores et al., 2012).

2.2. Aqueous extract

The endocarp (the pulp free of skin and seeds) from *C. ficifolia* fruit was cut into thin slices and dehydrated at room temperature with constant aeration. The dry material was crushed and macerated in water for 72 h. After each 24 h period, the aqueous phase was recovered. Subsequently, the aqueous extract was filtered and centrifuged at $805 \times g$. The supernatant was separated and freeze-dried to be dissolved in RPMI medium or incubated with RINm5F cells for different treatments (Díaz-Flores et al., 2012). A pure DCI standard was obtained from Sigma-Aldrich, and this compound was quantified in the *C. ficifolia* extract using high performance liquid chromatography (HPLC Waters 2695 separation module) (Roman-Ramos et al., 2012). A concentration of 1672 mg of DCI/g was found for the extract. In all the experiments, the aqueous extract of *C. ficifolia* was standardized based on the content of DCI.

2.3. RINm5F cell culture

RINm5F is an insulin-producing cell line derived from a pancreatic islet tumor that was commercially acquired from the American Type Culture Collection (ATCC). RINm5F cells were grown in monolayer culture using RPMI 1640 medium (glucose 11.1 mM) (GIBCO™), supplemented with 10% fetal bovine serum (ATCC), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 2 µg/mL gentamycin (Invitrogen). The cells were grown at 37 °C in disposable plastic bottles (Nunc™) under a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. The medium was replaced twice a week (Chen et al., 2011; Lim et al., 2011; Ortega-Camarillo et al., 2006).

2.4. MTT assay

The cell viability, following treatment with both *C. ficifolia* fruit and DCI alone, was measured using a 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-dihenzotetrazolium bromide (MTT, Sigma) assay, according to the method of Mosmann (Mosmann, 1983). The assay measures the conversion of MTT to insoluble formazan by dehydrogenase enzymatic activity of the intact cells. This assay is widely used for cytotoxicity, viability and proliferation studies. The amount of formazan produced is directly proportional to the number of living cells (Lim et al., 2011). RINm5F cells were seeded into 96-well microplates at a semi-confluent density (5000 cells/well). After 24 h, the medium was replaced with medium containing *C. ficifolia* extract at different concentrations: 1.8, 3.6, 7.2, 18, 36, 72, 180, 360 and 720 µg of extract/mL (which correspond to equivalent concentrations of DCI 10, 20, 40, 100, 200, 400, 1000, 2000 and 4000 µM, respectively), or these same concentrations of DCI alone (Sigma). The cells were treated for 30 min they were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, and a solution of MTT 0.1 mg/mL in PBS (pH 7.5) was added. The cells were incubated for 3 h at 37 °C, followed by washing with PBS. Then, 40 mM HCl (200 µL) prepared in isopropanol was added to each well for 15 min to solubilize the produced formazan. The optical density (OD) was read at 570 nm (Mosmann, 1983).

The data are expressed as the percentage of viable cells following treatment with the aqueous extract of *C. ficifolia* and DCI compared to the control cells.

2.5. Viability assays using DRAQ7™ probe

RINm5F cells were cultured using the Chamber Slide System (Lab-Tek II). The treated cells were cultured and imaged in RPMI-1640 (GIBCO™) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and antibiotics. The cells were grown in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C and trypsinized at 80% confluence using 0.05% trypsin EDTA (Sigma). The medium was refreshed every 48 h. *C. ficifolia* extract at a concentration of 72 µg of extract/mL (containing 400 µM of DCI) or 400 µM of DCI alone (Sigma) was used to treat cells cultured under suboptimal conditions for 30 min. *C. ficifolia* was substituted by DRAQ7™ (3 µM). The cells were washed twice with PBS. Subsequently, an assembly of PBS/glycerol/DAPI (Inorganic Polyphosphate Stores by 4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (1:1000) was performed to stain for the nucleus. Coverslips with cells were mounted in a custom-made steel holder, and the sample was placed on a microscope stage and imaged using the confocal microscope Zen-Sp1 ZEISS laser-scanning DRAQ7™ excited by both 488 and 633–647 nm lasers (Akagi et al., 2013; Wlodkovic et al. 2013).

2.6. Calcium measurement

RINm5F cells were cultured in Lab-Tek II eight-well glass slides. After 24 h of culture, the cells were loaded for 30 min with 1 µM of the

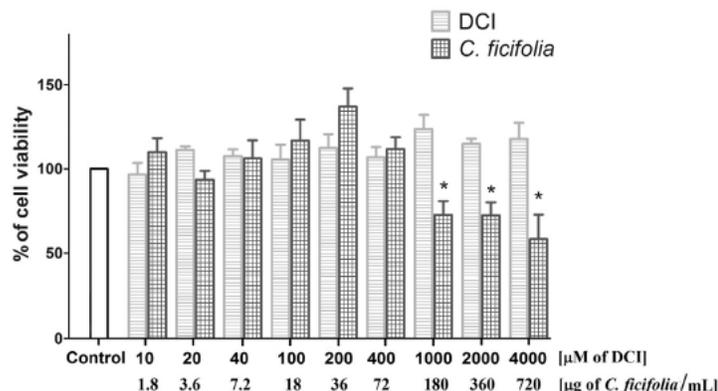


Fig. 1. The effect of different concentrations of *C. ficifolia* extract and DCI on the viability of RINm5F cells (MTT assay, T=1 h). The aqueous extract of *C. ficifolia* was standardized based on the content of DCI. S.E.M. (n=4). *p < 0.05 against the control.

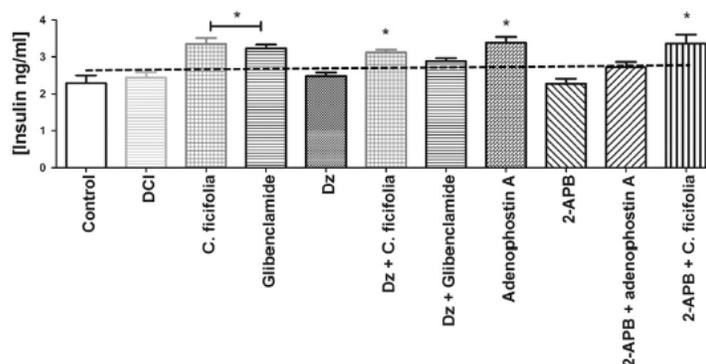


Fig. 2. The effect of different treatments on insulin secretion in RINm5F cells. *C. ficifolia* (72 μg of the extract/mL), DCI (400 μM), diazoxide (4000 μM, Dz), 2-APB (200 μM), adenophostin (8 μM), Dz (4000 μM)+*C. ficifolia* (72 μg of the extract/mL), Dz (4000 μM)+ glibenclamide (500 μM), 2-APB (200 μM)+ adenophostin A (8 μM) and 2-APB (200 μM)+*C. ficifolia* (72 μg of the extract/mL). Mean ± S. E. M. (n =4). *p < 0.05 against control.

3.4. Viability assays using DRAQ7™ probe

Because an increase in $[Ca^{2+}]_i$ may be associated with cellular damage due to the treatments, it was necessary to analyze the integrity of the cells with the reagent DRAQ7™, which quantifies stained nuclei. It indicated 100% viability in the control group (Fig. 4(A)) and in cells incubated with *C. ficifolia* (Fig. 4(B)). Contrarily, in the cells incubated with 40 μM H_2O_2 , the nucleus stained in red with the reagent DRAQ7™ indicated that 100% of the cells were unviable (Fig. 4(C)).

3.5. Participation of *C. ficifolia* as regulator of $[Ca^{2+}]_i$ through K_{ATP}^+ channels

The concentration-response curves were determined to probe the influence of *C. ficifolia* as a regulator of $[Ca^{2+}]_i$ through K_{ATP}^+ channels. Glibenclamide alone showed a clear increase in $[Ca^{2+}]_i$. However, in presence of Dz, the effect of glibenclamide was gradually inhibited, while diazoxide concentrations increased (Fig. 5(A)), resulting in a typical curve of competitive antagonism. In contrast, in the presence of Dz, *C. ficifolia* decreased $[Ca^{2+}]_i$, interfering with the maximum response (R_{max}) of Dz (Fig. 5(B), Table 1). In this case, the curves declined progressively, showing non-competitive antagonism. Therefore, the action of *C. ficifolia* on $[Ca^{2+}]_i$ should not involve K_{ATP}^+ channels. The data for Dz alone were omitted from Fig. 5.

3.6. Participation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors in $[Ca^{2+}]_i$

The concentration-response curves were determined to test whether the effect of *C. ficifolia* involves ER $[Ca^{2+}]_i$ reservoirs, and these curves are shown in Fig. 6. Adenophostin A alone increases $[Ca^{2+}]_i$. However, in presence of 2-APB, this effect was inhibited, while 2-APB concentrations increased (Fig. 6(A)), resulting in a typical curve indicating competitive antagonism. In contrast, *C. ficifolia* in presence of smaller concentrations of 2-APB, incremented $[Ca^{2+}]_i$. In this case, it is observed that R_{max} increases by the action of 2-APB and *C. ficifolia* (Table 2). However, at the largest dose, an inhibitory effect was observed with 2-APB, interfering with the *C. ficifolia* response (Fig. 6(B)). In this case, the curves display competitive dualism for inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors with $[Ca^{2+}]_i$.

3.7. An additive effect of 2-APB and low concentrations of *C. ficifolia* and the participation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors in $[Ca^{2+}]_i$

The concentration-response curves were used to determine the additive effect of 2-APB (50, 100, 150 and 200 μM) and lower concentrations of *C. ficifolia* (4.5, 9, 18 and 36 μg of extract/mL) on $[Ca^{2+}]_i$ due to inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors. These

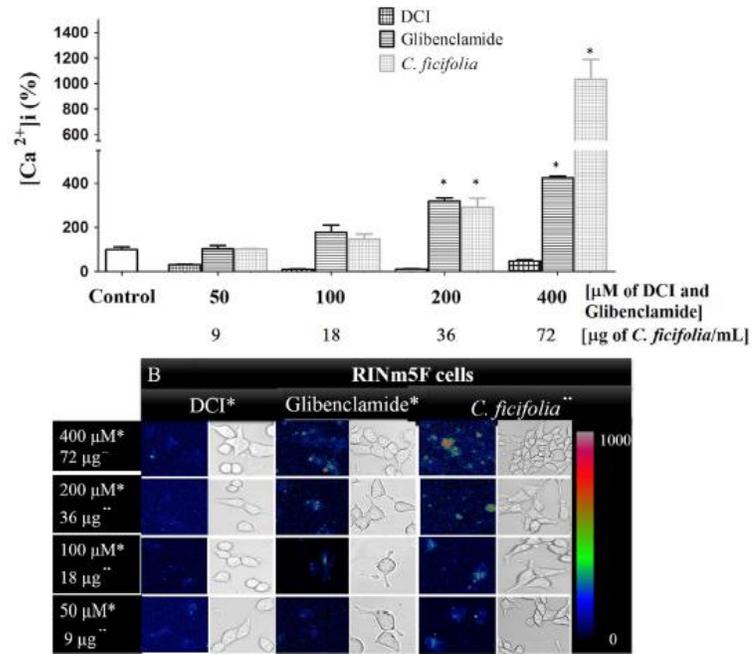


Fig. 3. The effect of *C. ficifolia*, DCI and glibenclamide on [Ca²⁺]_i in RINm5F cells (T=10 min). (A) The normalized fluorescence of [Ca²⁺]_i in cells due to treatments. The vertical scale bar indicates the increase in fluorescence due to the treatments. (B) The fluorescence of the RINm5F cells in the bright and dark field that shows changes in red and blue tones. The results are expressed as the mean ± S.E.M. (n=4). *p < 0.05 against control.

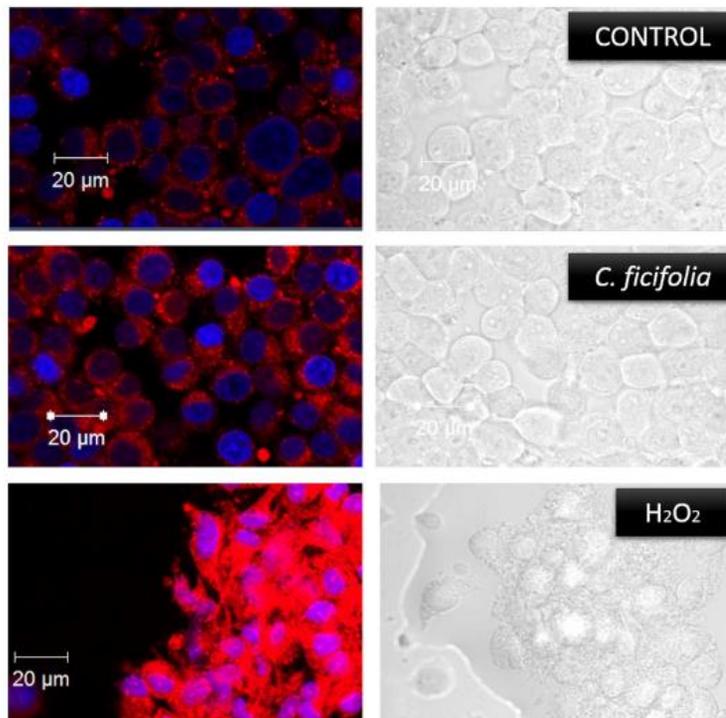


Fig. 4. Viability assays using DRAQ7™ probe. RINm5F cells treated with *C. ficifolia* and H₂O₂ (magnification × 20).

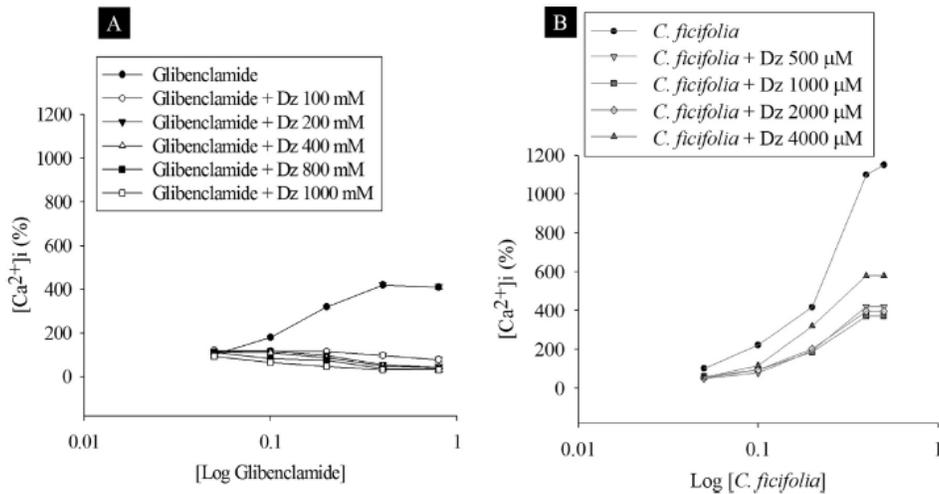


Fig. 5. The effect of the simultaneous administration of diazoxide (Dz) with glibenclamide or *C. ficifolia* on $[Ca^{2+}]_i$ in RINm5F cells. (A) Glibenclamide (50, 100, 200 and 400 μ M) with Dz. (B) *C. ficifolia* (9, 18, 36 and 72 μ g of the extract/mL) with Dz. Means \pm S.E.M. ($n=4$).

Table 1

$[Ca^{2+}]_i$ response of cells RINm5F treated with glibenclamide, glibenclamide and diazoxide (Dz), *C. ficifolia*, pretreated with Dz in the presence of *C. ficifolia* and Dz alone.

Treatment	IC ₅₀	R _{max} (%)
Glibenclamide	260.0 \pm 9.1	426.4 \pm 8.6 ^a
Glibenclamide + Dz (1000 μ M)	150.0 \pm 8.8	76.8 \pm 9.6
<i>C. ficifolia</i>	45.0 \pm 12.2	1103.6 \pm 9.8 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Dz (1000 μ M)	34.2 \pm 9.1	372.0 \pm 13.3 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Dz (2000 μ M)	36.0 \pm 13.1	400.0 \pm 14.1 ^a
<i>C. ficifolia</i> + Dz (4000 μ M)	34.2 \pm 14.1	600.0 \pm 10.1 ^a
Diazoxide ^a	500.0 \pm 12.5	65.0 \pm 12.9

Data represent mean \pm standard deviation ($n=4$); IC₅₀ for glibenclamide is expressed in μ M; IC₅₀ for *C. ficifolia* is expressed in μ g/mL. ^a $p < 0.05$ vs. Dz. ^aThe curve of Dz alone was not included in Fig. 5.

Table 2

$[Ca^{2+}]_i$ response of cells RINm5F in the presence of adenophostin, adenophostin and 2-APB, *C. ficifolia*, pretreated with 2-APB in the presence of *C. ficifolia* and 2-APB alone.

Treatment	IC ₅₀	R _{max} (%)
Adenophostin	4.0 \pm 0.5	396.0 \pm 7.8 ^a
Adenophostin + 2-APB (50 μ M)	5.0 \pm 1.2	95.0 \pm 12.9
Adenophostin + 2-APB (100 μ M)	1.0 \pm 0.5	114.9 \pm 5.3
Adenophostin + 2-APB (200 μ M)	2.0 \pm 1.3	106.4 \pm 25.5
<i>C. ficifolia</i>	45.0 \pm 12.2	1103.6 \pm 9.8 ^a
<i>C. ficifolia</i> + 2-APB (50 μ M)	36.0 \pm 12.2	1663.6 \pm 11.2 ^a
<i>C. ficifolia</i> + 2-APB (100 μ M)	34.2 \pm 14.1	1208.0 \pm 12.3 ^a
<i>C. ficifolia</i> + 2-APB (200 μ M)	36.0 \pm 25.5	1018.0 \pm 353.9 ^a
2-APB ^b	200.0 \pm 15.9	80.6 \pm 12.4

Data represent mean \pm standard deviation ($n=4$); IC₅₀ for adenophostin is expressed in μ M; IC₅₀ for *C. ficifolia* extract is expressed in μ g/mL. ^a $p < 0.05$ vs. 2-APB. The curve of 2-APB alone is included in Fig. 7.

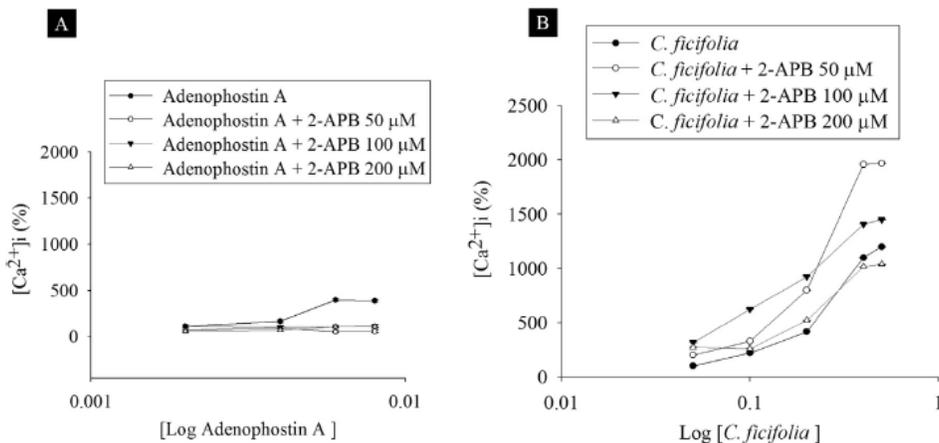


Fig. 6. The effect of the simultaneous administration of adenophostin with 2-APB or *C. ficifolia* on $[Ca^{2+}]_i$ in RINm5F cells. (A) Adenophostin A (2, 4, 6 and 8 μ M) with 2-APB. (B) *C. ficifolia* (9, 18, 36, 72 and 90 μ g of extract/mL) with 2-APB. Means \pm S.E.M. ($n=4$).

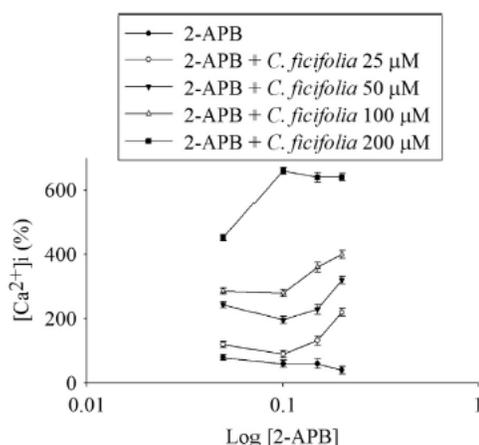


Fig. 7. The additive effect of 2-APB (50, 100, 150 and 200 μ M) and low concentrations of *C. ficifolia* (4.5, 9, 18 and 36 μ g of the extract/mL) on the release of $[Ca^{2+}]_i$. Means \pm S. E. M. (n=4).

curves are shown in Fig. 7. Notably, an additive effect was observed at all dose combinations (Fig. 7).

4. Discussion

Previously, it was suggested that *C. ficifolia* increases the plasma insulin in streptozotocin-induced diabetic rats (Xia and Wang, 2006). However, the participation and the source of $[Ca^{2+}]_i$ in the secretion of insulin caused by *C. ficifolia* were uncertain. In the present investigation, it was determined if the increase in $[Ca^{2+}]_i$ is provided from the exterior of the cell or from the ER by exploring the effects of the pharmacological interactions of distinct drugs and *C. ficifolia* on the K_{ATP} channel and on the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor.

The aqueous extract from the fruit of *C. ficifolia* with its DCI content standardized (167.2 mg/g of extract) and DCI alone were evaluated. The concentrations were expressed in terms of DCI because it will support the standardization and continuity of the studies with the extract of *C. ficifolia* standardized in DCI. This is specially important due to that different preparations of the same extract can contain variable concentrations of DCI. For instance, in the present investigation we assayed an aqueous extract from the fruit of *C. ficifolia* which contained 167.2 mg of DCI/g of extract, and this content of DCI was highest than those previously reported for other *C. ficifolia* preparations of the same extract (Miranda-Pérez et al., 2013). Differences in DCI content could depend of the regions of collect, annual season, or state of maturity of fruit, as it has been reported for other plants (Buenz et al., 2007).

C. ficifolia showed a concentration-dependent cytotoxic effect at 1 h of incubation. In contrast, DCI alone did not affect the cell viability at the concentrations administered (10–4000 μ M). In relation to $[Ca^{2+}]_i$, cells treated with *C. ficifolia* and glibenclamide showed changes in fluorescence in red, green and blue tones, indicating significant increase in $[Ca^{2+}]_i$, which positively correlated with increases in the concentrations of insulin. However, DCI caused a reduction of more than 50% in $[Ca^{2+}]_i$ in all the doses given, which also correlated positively with the absence of effect on insulin secretion. Therefore, DCI was excluded from the subsequent experiments. Consequently, in addition to the concentration molar of DCI in the extract, the concentrations also were expressed in mg of extract/mL. This also is important because DCI at

seem is not the active principle and *C. ficifolia* might be a potential natural resource for new agents against type II diabetes.

As an increase in $[Ca^{2+}]_i$ may trigger ER stress and cell death because of the treatments, it was necessary to analyze the integrity of the cells with the reagent DRAQ7™, which quantifies stained nuclei. Thus, the cells incubated with *C. ficifolia* showed 100% viability, similar to the control group. Therefore, the increase in $[Ca^{2+}]_i$ caused by *C. ficifolia* might explain the augmented insulin secretion and does not represent any sign of cellular damage.

When *C. ficifolia* was administered in conjunction with Dz, a competitive inhibitor of insulin secretion induced by glibenclamide through the opening of K_{ATP} channels, the insulin secretion caused by *C. ficifolia* did not affect. Therefore, Dz seems not affect the secretion of insulin caused by *C. ficifolia* and, to determine the mechanism of this pharmacological interaction, the concentration-response curves for Ca^{2+} were determined.

The different concentrations of Dz prevented the increase in $[Ca^{2+}]_i$ caused by glibenclamide because both agents compete for the same site in K_{ATP} channels, exhibiting a typical curve displaying competitive antagonism (Gopalakrishnan et al., 2000). In contrast, although Dz also inhibited the release of $[Ca^{2+}]_i$ caused by *C. ficifolia*, the curve exhibited noncompetitive antagonism. This result indicates that *C. ficifolia* does not block K_{ATP} channels, which is consistent with a previous report in which *C. ficifolia* did not block these channels in the rat thoracic aorta (Banderas-Dorantes et al., 2012).

However, the highest concentrations of Dz in presence of *C. ficifolia* increased $[Ca^{2+}]_i$. This increase may be the result of the activation of other different vias to channels ATP-dependent potassium, which are activated as a compensatory mechanism to the incapacity of this channels of sustain the normal levels of intracellular Ca^{2+} due mainly to the high concentrations of Dz. In fact, the simultaneous administration of glibenclamide and *C. ficifolia* should result in a synergistic effect. However, this have to be determined in further studies. Therefore, another mechanism for the release of $[Ca^{2+}]_i$ that does not involve K_{ATP} channels was explored, such as the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor.

In relation to adenophostin A (an agonist of the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor), different concentrations of 2-APB prevented the increase in $[Ca^{2+}]_i$ because both agents compete for the same site in the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor, and the dose-response curve exhibited a typical curve of competitive antagonism (Fig 6(A)). This result agrees with previous reports on adenophostin A and 2-APB (Ding et al., 2010; Bootman et al., 2002; Jarrard et al., 2013). In contrast, although 2-APB also inhibited the release of $[Ca^{2+}]_i$ caused by *C. ficifolia*, this curve exhibited apparent competitive dualism (Fig. 6(B)). This was clearly confirmed when the compound was incubated with *C. ficifolia* at lower concentrations (Fig. 7). These results are consistent with previous reports; low doses 2-APB could not effectively block InsP receptors, when it incubated with other molecules of these receptors agonists (Park et al., 2002). Therefore, we suggest that 2-APB and low concentrations of *C. ficifolia* have additive effects on the induction of $[Ca^{2+}]_i$ in RINm5F cell.

Finally, previous reports indicated that *C. ficifolia* increases the expression of mRNA insulin (Miranda-Perez et al., 2013), which might be associated to the increased insulin secretion. Therefore, this work represents also an approaching to the elucidation of the hypoglycaemic action mechanism of *C. ficifolia*.

5. Conclusion

The hypoglycemic properties of *C. ficifolia* can be explained in part by its effects on the secretion of insulin through an increase in $[Ca^{2+}]_i$ by the activation of the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)

receptor in the ER. This mechanism is different to those of the currently used hypoglycemic drugs, such as sulfonylureas. Our results support that *C. ficifolia* may be a potential natural resource for the development of new agents to control T2D.

Acknowledgements

This work was partially supported by Research Grant Agreement No. F/3338–2F, the Multidisciplinary Project 8110119 of the Metropolitan Autonomous University, PROMEP-SEP (P/CA-15–2006–35–53) and Fondo de Investigación en Salud, IMSS (Grant: FIS/IMSS/PROT/G13/1226).

References

- Acosta-Patino, J.L., Jimenez-Balderas, E., Juarez-Oropeza, M.A., Diaz-Zagoza, J.C., 2001. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J. Ethnopharmacol.* 77, 99–101.
- Akagi, J., Kordon, M., Zhao, H., Matuszek, A., Dobrucki, J., Errington, R., Smith, P.J., Takeda, K., Darzynkiewicz, Z., Wlodkovic, D., 2013. Real-time cell viability assays using a new anthracycline derivative DRAQ7(R). *Cytom. A* 83, 227–234.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Hernandez-Galicia, E., Campos-Sepulveda, A.E., Xolalpa-Molina, S., Rivas-Vilchis, J.F., Vazquez-Carrillo, L.I., Roman-Ramos, R., 2002. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouche (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 82, 185–189.
- Banderas-Dorantes TR, Roman-Ramos R, Zamilpa A, Garcia-Macedo R, Campos MC, Tortoriello J, Alarcon-Aguilar FJ, 2012. Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (*Cucurbita ficifolia* Bouché and *Ibervillea sonorae* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings. *BLACPMA*, 6, pp. 510–519.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J., Peppiari, C. M., 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca^{2+} release. *FASEB J.* 16, 1145–1150.
- Buenz, E.J., Tillner Jr, J.E., Limburg, P., Bauer, B.A., 2007. Antibacterial properties and toxicity of *Atuna racemosa* extract depend on kernel maturity. *J. Ethnopharmacol.* 111, 592–597.
- Clark, R., Proks, P., 2010. ATP-sensitive potassium channels in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 654, 165–192.
- Chang, C.L., Lin, Y., Bartolome, A.P., Chen, Y.C., Chiu, S.C., Yang, W.C., 2013. Herbal therapies for type 2 diabetes mellitus: chemistry, biology, and potential application of selected plants and compounds. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 378657.
- Chen, F., Zhu, Y., Tang, X., Sun, Y., Jia, W., Sun, Y., Han, X., 2011. Dynamic regulation of PDX-1 and FoxO1 expression by FoxA2 in dexamethasone-induced pancreatic beta-cells dysfunction. *Endocrinology* 152, 1779–1788.
- Diaz-Flores, M., Angeles-Mejia, S., Baiza-Gutman, L.A., Medina-Navarro, R., Hernandez-Saavedra, D., Ortega-Camarillo, C., Roman-Ramos, R., Cruz, M., Alarcon-Aguilar, F.J., 2012. Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouche on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 144, 101–108.
- Diaz-Garcia, C.M., Sanchez-Soto, C., Fuentes-Silva, D., Leon-Pinzon, C., Dominguez-Perez, D., Varela, C., Rodriguez-Romero, A., Castaneda, O., Hiriart, M., 2012. Low molecular weight compounds from *Zoanthus sociatus* impair insulin secretion via Ca^{2+} influx blockade and cause glucose intolerance in vivo. *Toxicol* 59, 306–314.
- Ding, Z., Rossi, A.M., Riley, A.M., Rahman, T., Potter, B.V., Taylor, C.W., 2010. Binding of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and adenophostin A to the N-terminal region of the IP3 receptor: thermodynamic analysis using fluorescence polarization with a novel IP3 receptor ligand. *Mol. Pharmacol.* 77, 995–1004.
- Dufer, M., Haspel, D., Krippel-Drews, P., Kelm, M., Ranta, F., Nitschke, R., Ullrich, S., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., Drews, G., 2007. The KATP channel is critical for calcium sequestration into non-ER compartments in mouse pancreatic beta cells. *Cell Physiol. Biochem.* 20, 65–74.
- Fortis-Barrera, A., Alarcon-Aguilar, F.J., Banderas-Dorantes, T., Diaz-Flores, M., Roman-Ramos, R., Cruz, M., Garcia-Macedo, R., 2013. *Cucurbita ficifolia* Bouche (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1563–1576.
- Gopalakrishnan, M., Molinari, E.J., Shieh, C.C., Monteggia, L.M., Roch, J.M., Whiteaker, K.L., Scott, V.E., Sullivan, J.P., Brioni, J.D., 2000. Pharmacology of human sulphonylurea receptor SUR1 and inward rectifier K^{+} channel Kir6.2 combination expressed in HEK-293 cells. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1323–1332.
- Han, J., Lee, H.H., Kwon, H., Shin, S., Yoon, J.W., Jun, H.S., 2007. Engineered enteroendocrine cells secrete insulin in response to glucose and reverse hyperglycemia in diabetic mice. *Mol. Ther.* 15, 1195–1202.
- Hussain, Z., Waheed, A., Qureshi, R.A., Burdi, D.K., Verspohl, E.J., Khan, N., Hasan, M., 2004. The effect of medicinal plants of Islamabad and Murree region of Pakistan on insulin secretion from INS-1 cells. *Phytother. Res.* 18, 73–77.
- Jarrard, R.E., Wang, Y., Salyer, A.E., Pratt, E.P., Soderling, I.M., Guerra, M.L., Lange, A. M., Broderick, H.J., Hockerman, G.H., 2013. Potentiation of sulfonylurea action by an EPAC-selective cAMP analog in INS-1 cells: comparison of tolbutamide and gliclazide and a potential role for EPAC activation of a 2-APB-sensitive Ca^{2+} influx. *Mol. Pharmacol.* 83, 191–205.
- Jhun, B.S., Lee, H., Jin, Z.G., Yoon, Y., 2013. Glucose stimulation induces dynamic change of mitochondrial morphology to promote insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1E. *PLoS One* 8, e60810.
- Keller, A.C., Ma, J., Kavalier, A., He, K., Brillantes, A.M., Kennelly, E.J., 2011. Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro. *Phytomedicine* 19, 32–37.
- Lim, S., Rashid, M.A., Jang, M., Kim, Y., Won, H., Lee, J., Woo, J.T., Kim, Y.S., Murphy, M.P., Ali, L., Ha, J., Kim, S.S., 2011. Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic beta-cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Cell Physiol. Biochem.* 28, 873–886.
- Miranda-Perez, M.E., Escobar-Villanueva, M.C., Ortega-Camarillo, C., Sanchez-Muñoz, F., Almanza-Perez, J.C., Alarcon-Aguilar, F.J., 2013. *Cucurbita ficifolia* Bouche fruit acts as an insulin secretagogue in RINm5F cells. *Int. Biotech. Color J.* 3, 8–14.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Ortega-Camarillo, C., Guzman-Grenfell, A.M., Garcia-Macedo, R., Rosales-Torres, A. M., Avalos-Rodriguez, A., Duran-Reyes, G., Medina-Navarro, R., Cruz, M., Diaz-Flores, M., Kumate, J., 2006. Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Mol. Cell Biochem.* 281, 163–171.
- Park, M.K., Lee, K.K., Uhm, D.Y., 2002. Slow depletion of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores and block of store-operated Ca^{2+} channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate in mouse pancreatic acinar cells. *Naunyn Schmiede. Arch. Pharmacol.* 365, 399–405.
- Roman-Ramos, R., Almanza-Perez, J.C., Fortis-Barrera, A., Angeles-Mejia, S., Banderas-Dorantes, T.R., Zamilpa-Alvarez, A., Diaz-Flores, M., Jasso, L., Blancas-Flores, G., Gomez, J., Alarcon-Aguilar, F.J., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouche in streptozotocin-induced diabetes mice. *Am. J. Chin. Med.* 40, 97–110.
- Roman Ramos, R., Lara Lemus, A., Alarcon Aguilar, F., Flores Saez, J.L., 1992. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch. Med. Res.* 23, 105–109.
- Rorsman, P., Braun, M., 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 155–179.
- Seshadri, V.S., More T.A., Studium Press Pvt., 2009. *Cucurbit vegetables: biology, production and utilization*. Studium Press Pvt., p. 482.
- Szollósi, A., Nenquin, M., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., Henquin, J.C., 2007. Glucose stimulates Ca^{2+} influx and insulin secretion in 2-week-old beta-cells lacking ATP-sensitive K^{+} channels. *J. Biol. Chem.* 282, 1747–1756.
- Tanaka, T., Nagashima, K., Inagaki, N., Kioka, H., Takashima, S., Fukuoka, H., Noji, H., Kakizuka, A., Imamura, H., 2014. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca^{2+} influx and subsequent Ca^{2+} oscillations. *J. Biol. Chem.* 289, 2205–2216.
- D., Wlodkovic, J., Akagi, J., Dobrucki, R., Errington, P.J., Smith, K., Takeda, and Z. Darzynkiewicz, 2013. Kinetic Viability Assays using DRAQ7 (probe). (*Curr Protoc Cytom.*) (Chapter 9): (Unit 9 41).
- Wu, B., Wei, S., Petersen, N., Ali, Y., Wang, X., Bacaj, T., Rorsman, P., Hong, W., Sudhof, T.C., Han, W., 2015. Synaptotagmin-7 phosphorylation mediates GLP-1-dependent potentiation of insulin secretion from beta-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 9996–01.
- Xia, T., Wang, Q., 2006a. Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Fitoterapia* 77, 530–533.
- Xia, T., Wang, Q., 2006b. D-chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozotocin-diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1527–1532.



Cucurbita ficifolia Bouché
Incrementa la secreción de
insulina en células RINm5F a
través del aumento en las
[Ca²⁺]_i proveniente del retículo
endoplásmico.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de febrero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
- DRA. ALMA DELIA CHAVEZ BLANCO
- DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA
- DRA. REBECA GARCIA MACEDO

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

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: MARIA ELIZABETH MIRANDA PEREZ

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

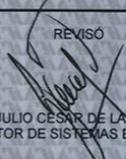
Aprobar

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



Miranda P.M. Elizabeth
MARIA ELIZABETH MIRANDA PEREZ
ALUMNA

REVISÓ



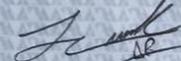
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE



DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL



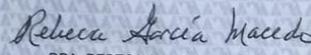
DRA. ALMA DELIA CHAVEZ BLANCO

VOCAL



DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA

SECRETARIA



DRA. REBECA GARCIA MACEDO

