

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL



Proliferación de células β pancreáticas en ratones diabéticos

tratados con *Cucurbita ficifolia Bouché*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

B.E. Jessica García González.

Directores:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dr. Mario García Lorenzana

Asesores:

Dr. Julio César Almanza Pérez

Dra. Rebeca García Macedo

México D.F.

Diciembre 2011

COMITÉ TUTORAL

Codirector

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular "C"

Lab. de Farmacología

Depto. Ciencias de la Salud

D. C. B. S. UAM-Iztapalapa

Codirector

Dr. Mario García Lorenzana

Profesor Titular "C"

Lab. de Neurobiología Tisular

Depto. Biol. de la Reproducción

D. C. B. S. UAM-Iztapalapa

Asesor

Dr. Julio César Almanza Pérez

Profesor Titular "C"

Lab. de Farmacología

Depto. Ciencias de la Salud

D. C. B. S. UAM-Iztapalapa

Asesora

Dra. Rebeca García Macedo

Investigador Asociado "C"

UIM en Bioquímica

Hospital de Especialidades

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

“El programa de la maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 001481 y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

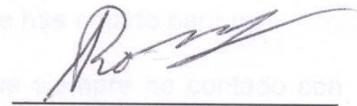
Número de registro de la beca otorgada por CONACyT y CVU del becario 330726 y 234251.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud y en el laboratorio de Neurobiología Tisular, área de Neurociencias del Departamento de Biología de la Reproducción, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

“Los miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Proliferación de células β pancreáticas en ratones diabéticos tratados con *Cucurbita ficifolia* Bouché”. Con fecha 12 de Diciembre de 2011.

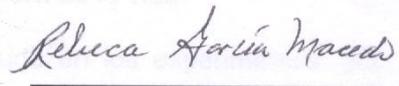
Dr. Rubén Román Ramos (Presidente)

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



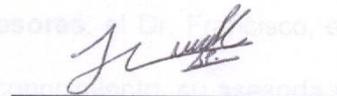
Dra. Rebeca García Macedo (Secretario)

Investigador Asociado C
UIM en Bioquímica
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS
gamareb@yahoo.es



Dr. Julio César Almanza Pérez (Vocal)

Profesor titular C
Dpto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
jcap@xanum.uam.mx



Dra. Elizabeth Hernández Pérez. (Vocal)

Profesor titular C
Dpto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa
sil@xanum.uam.mx



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por conducirme en el camino de la sabiduría, de la que nacen la ciencia y la prudencia.

A Juana González y Aurelio García (mis padres) por su trabajo, su gran ejemplo de lucha, amor y su apoyo en esta anhelada meta, lo cual justifica su ausencia. Los amo.

A mi abue Fran por existir, por sus sabios consejos que me han permitido ser una persona de bien, por soportar mis errores y por que siempre has estado para mi.

A mis hermanas Bertha, Marce, Jackye e Ivette por que siempre he contado con ustedes, por su confianza, por ser las mejores amigas y por que siempre nos tendremos.

A Rafa por creer en mí, por tu apoyo, por que me has acompañado siempre en buenos y difíciles momentos de esta larga escalera de la vida.

A mis amigos, el mejor equipo sin duda; por su ayuda en los experimentos, por compartir su conocimiento, su tiempo, sus ideas, sus consejos, sus risas y darme buenos momentos. Gracias Gaby, Angeles, Julio, Iván, Andrew, Gerard y Tania. Mis amigos de generación Ana, Robert y Carlos.

En especial a las personas que hoy no están conmigo, pero que fueron parte de la motivación, por sus palabras de aliento, por que aprendí mucho y por los grandes momentos que alegraron mis días.

Mis más sinceros agradecimientos a mis **maestros y asesores**: el Dr. Francisco, el Dr. Mario, el Dr. Julio y la Dra. Rebeca por compartir su conocimiento, su asesoría y su tiempo en la realización de este proyecto.

ÍNDICE

Resumen. -----	13
Abstract. -----	15
1. Introducción. -----	17
1.1 Diabetes mellitus. -----	18
1.1.2 Tipos de diabetes. -----	18
1.1.3 Complicaciones en la diabetes. -----	20
1.2 El páncreas. -----	22
1.2.1 Célula beta (β) pancreática. -----	24
1.2.2 Proliferación de la célula β pancreática. -----	25
1.2.3 Ciclo celular de la célula β pancreática.-----	27
1.3 Tratamiento de la diabetes.-----	30
2. Antecedentes. -----	31
3. Justificación. -----	36
4. Hipótesis. -----	37
5. Objetivo General.-----	37
6. Objetivos particulares.-----	37
7. Metodología. -----	38
7.1 Material vegetal.-----	38
7.2 Obtención del extracto acuoso. -----	38
7.3 Análisis fitoquímico del extracto de <i>Cucurbita ficifolia</i> . -----	38
7.4 Animales de experimentación. -----	39
7.5 Evaluación del efecto hipoglucémico del extracto de <i>C. ficifolia</i> . -----	39
7.6 Estudio farmacológico. -----	40

7.7 Cuantificación de los parámetros bioquímicos. -----	40
7.8 Cuantificación de las concentraciones de insulina. -----	41
7.9 Obtención y fijación del material histológico. -----	42
7.10 Tinción H-E. -----	42
7.11 Tinción de PAS en hígado.-----	43
7.12 Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CDK4. -----	44
7.13 Análisis histológico. -----	45
8. Análisis estadístico. -----	46
9. Resultados. -----	46
9.1 Rendimiento y caracterización del extracto de <i>C. ficifolia</i> . -----	46
9.2 Efecto de <i>C. ficifolia</i> sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa. -----	46
9.3 Efecto de la administración diaria de <i>C. ficifolia</i> sobre parámetros bioquímicos. -----	48
9.4 Efecto de <i>C. ficifolia</i> sobre las concentraciones séricas de insulina. -----	50
9.5 Efecto de <i>C. ficifolia</i> sobre la histología de hígado. -----	52
9.6 Efecto de <i>C. ficifolia</i> sobre la histología de riñón. -----	56
9.7 Efecto del de <i>C. ficifolia</i> sobre el páncreas. -----	58
10. Discusión. -----	62
11. Conclusiones. -----	67
12. Referencias. -----	68

Índice de abreviaturas

ADP. Adenosín difosfato

AEC. 3 amino-9-etilcarbazol

AGE. Productos finales de glicación avanzada

ANOVA. Análisis de varianza

ATP. Adenosín trifosfato

ATPasa. Enzima capaz de hidrolizar ATP

C. *Cucurbita*

Ca²⁺. Calcio

CD-1. Antígeno CD1

CDKs. Cinasas dependientes de ciclinas

CDK2. Cinasa tipo 2 dependiente de ciclina

CDK4. Cinasa tipo 4 dependiente de ciclina

CDK6. Cinasa tipo 6 dependiente de ciclina

Cip/Kip. Interacción de proteínas CDK/proteína cinasa inhibidora

DAB. Diaminobenzidina

DAP. Peroxidasa – antiperoxidasa

DM. Diabetes mellitus

DMSO. Dimetil sulfóxido

DRTFP. Differentiation regulated transcription factor protein (DRTF)

DPP-1V. Dipeptidil peptidasa IV

DQI. D-qui-ro-inositol

DT1. Diabetes tipo 1

DT2. Diabetes tipo 2

E2F1. Factor de transcripción E2F1

G₀. Fase de quiescencia del ciclo celular

G₁. Fase de crecimiento 1 del ciclo celular

G₂. Fase de crecimiento 2 del ciclo celular

GAD65. Descarboxilasa de ácido glutámico

GIP. Polipéptido inhibidor gástrico

GL. Grados Gay Lussac

GLP-1. Péptido 1 similar al glucagón

GLUT-1. Transportador de glucosa 1

GLUT-2. Transportador de glucosa 2

GOT. Transaminasa glutámico oxaloacética

GPT. Transaminasa glutámico pirúvica

H₂O₂. Peróxido de hidrógeno

HbA1c. Hemoglobina glicada

H-E. Hematoxilina de Harris – Eosina amarillenta

HPLC. Cromatografía líquida de alta presión (High Performance Liquid Chromatography)

IA. Antígeno de insulinoma

IA-2. Antígeno de insulinoma 2

IA-2β. Antígeno de insulinoma 2 beta

ICA-69. Antígeno de los islotes pancreáticos

IFN-γ. Interferón gamma

IL-6. Interleucina 6

IL-10. Interleucina 10

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía

INK4. Inhibidores de cinasas 4

K⁺. Potasio

K_{ATP}. Canal de potasio dependiente de ATP

Kir6.2. Canal de potasio rectificador (Inwardly rectifying potassium)

M. Mitosis

NADPH. Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida

NO. Óxido nítrico

NOM. Norma Oficial Mexicana

P16^{INK4a}, P15^{INK4b}, P18^{INK4c} y P19^{INK4d}. Proteínas inhibidoras de cinasas dependientes de ciclinas

PAS. Ácido periódico de Schiff

PBS. Buffer de fosfatos

PKC. Proteincinasa C

PI3K. Fosfatidil inositol 3 cinasa

PPAR α . Receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa

PPAR γ . Receptores activados por proliferadores de peroxisomas gamma

pRB. Proteína de retinoblastoma

S. Fase de síntesis del ciclo celular

Ser780. Serina 780

SSI. Solución salina isotónica

STZ. Estreptozotocina

SUR1. Receptor de sulfonilurea 1

TBS. Buffer tris salino

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa.

TZDs. Tiazolidinedionas

VDCC. Canales de calcio dependientes de voltaje

VIP. Células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo

Células α . Células alfa pancreáticas

Células β . Células beta pancreáticas

Células δ . Células delta pancreáticas

Resumen

En México, la diabetes mellitus (DM) es una de las principales causas de muerte debido a las complicaciones vasculares que la acompañan, reduciendo la expectativa de vida de las personas que la padecen y ubicándose como una enfermedad con gastos excesivos en su prevención y control. Se estima que en el mundo hay más de 346 millones de adultos con diabetes y que en el 2030 se convertirá en la séptima causa de muerte.

La DM caracteriza por un estado de hiperglucemia crónico debido a defectos en la acción y/o secreción de insulina, además de presentar alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La diabetes tipo 2 (DT2) se presenta principalmente en edad adulta y se caracteriza por resistencia y disminución de la insulina, teniendo como consecuencia la disfunción progresiva de las células β del páncreas, las cuales tienen una baja capacidad de regeneración; sin embargo, hoy en día se tienen evidencias de la existencia de marcadores moleculares que regulan el ciclo de la célula β , como la cinasa tipo 4 dependiente de ciclina (CDK4), involucrada en la capacidad de regeneración, crecimiento y con la vía de síntesis de insulina, ya que se encuentra regulando la fase G1 de ciclo celular, representando uno de los marcadores más importantes de proliferación de la célula β .

La importancia epidemiológica de la diabetes y el desarrollo de las complicaciones vasculares ha llevado a proponer nuevas alternativas farmacológicas que disminuyan dichas complicaciones. En México, una planta que se utiliza empíricamente en el control de la DT2 es *Cucurbita ficifolia* Bouché (*C. ficifolia*). Se tienen evidencias experimentales y clínicas acerca de su acción hipoglucemiante. Así mismo, algunas observaciones histológicas preliminares sugieren que *C. ficifolia*

podría aumentar la densidad celular en los islotes de Langerhans del páncreas de ratón. Sin embargo, dichas observaciones requieren ser confirmadas a través de estudios morfológicos cuantitativos e inmunohistoquímicos más precisos.

En el presente estudio se realizó un estudio morfológico en hígado, riñón y páncreas de ratones sanos y diabéticos tratados diariamente con *C. ficifolia*, cuantificando en este último órgano el número de islotes y su densidad celular. Además, se estudió el efecto sobre CDK4 (un marcador de proliferación celular), así como sobre las concentraciones séricas de insulina en el mismo modelo. Esto con la finalidad de conocer si *C. ficifolia* es capaz de incrementar la producción de insulina por un mecanismo que podría implicar regeneración de las células β pancreáticas.

Los resultados mostraron que la administración de *C. ficifolia* a ratones sanos y diabéticos reduce los niveles de glucemia y corrige algunos parámetros característicos de DT2. Además, *C. ficifolia* incrementó las concentraciones de insulina, así como de CDK4 en los islotes pancreáticos, sin alterar la morfología de este órgano. *C. ficifolia* tendió a mantener la estructura general del hígado y riñón. *C. ficifolia* modificó también la distribución del glucógeno hepático, sugiriendo que el mecanismo de acción de la planta podría estar mediado tanto por la síntesis de insulina a través de CDK4, como por la vía de síntesis de glucógeno.

C. ficifolia representa una alternativa terapéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus, con efecto hipoglucémico en hígado y regenerador pancreático, lo que potencialmente podría ayudar a un mejor control de la diabetes, previniendo el desarrollo de complicaciones vasculares y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Abstract

In Mexico, diabetes mellitus (DM) is one of the leading causes of death due to vascular complications that accompany it, reducing the life expectancy of the patients, and it is considered as a disease with excessive cost for prevention and control. It is estimated that the world has more than 346 million people with diabetes and in 2030 will become the seventh leading cause of death.

The DM is characterized by a chronic state of hyperglycemia due to defects in the action and/or secretion of insulin, causing alterations in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. In particular, type 2 diabetes (DT2) occurs mostly in adulthood and is characterized by resistance and decreased in the secretion of insulin, as resulted of progressive dysfunction of pancreatic β cells, which have a low capacity for regeneration. The cyclin-dependent kinase type 4 (CDK4), which is involved in the cell regeneration capacity, as well as in the growth and biosynthesis of insulin, which regulating cell cycle in the G1 phase, represents one of the most important markers of proliferation of the β cell.

The high incidence, prevalence and mortality due to diabetes, as well as its vascular complications, have led to propose new pharmacological alternatives of treatment. *Cucurbita ficifolia* Bouché (*C. ficifolia*), a plant used empirically in the control of DT2 in Mexico, has shown hypoglycemic activity in clinical and experimental studies. In addition, some preliminary histological observations suggest the possibility of increased cell- β density in the islets of Langerhans of mouse pancreas. However, these observations require support through morphological and immuno-histochemical quantitative studies.

In order to establish the basis for proposing to *C.ficifolia* like an alternative therapy with capacity of regenerate the pancreas, through the augmenting the proliferation of cells- β pancreatic, which may avoid the development of vascular complications, in the present research a morphological study was performed in liver, kidney and pancreas in normal and diabetic mice treated with *C. ficifolia*, quantifying the number of islets and its cellular density in pancreas. In addition, the effect on CDK4 (a cell proliferation marker) was evaluated, as well as on the serum concentrations of insulin in the same experimental model.

The results showed that *C. ficifolia* reduces blood glucose levels, correcting some characteristic parameters of DT2. In addition, *C. ficifolia* increased insulin levels, as well as CDK4 in the pancreatic islets without altering the morphology of this organ. *C. ficifolia* treated of maintain the overall structure of the liver and kidney.

C. ficifolia also modified the distribution of liver glycogen, suggesting that in the mechanism of action of the extract may be involved both the synthesis of insulin by CDK4 as the glycogen synthesis pathway.

C. ficifolia may be considered a therapeutic alternative in the treatment of diabetes mellitus, with both liver hypoglycemic effect and pancreatic regenerator, which could slow the development of vascular complications and improve quality of life of patients with diabetes.

1. Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades con mayor demanda hospitalaria a nivel mundial. El número de pacientes diabéticos en el mundo ha aumentado en las últimas dos décadas, lo cual ha sido asociado con cambios en el ambiente social y/o el estilo de vida, favoreciendo el aumento gradual en la incidencia de la obesidad y finalmente en el desarrollo de DM (Zimmet *et al.*, 2001).

La prevalencia mundial de diabetes entre los adultos (de 20 a 79 años) en el 2010 fue de 6.4%, afectando a 285 millones de adultos, y aumentará a 7.7% afectando a 439 millones de adultos para el año 2030, por lo que se estima que habrá un aumento del 69% en el número de adultos con diabetes en países en desarrollo y un aumento del 20% en los países desarrollados (Shaw *et al.*, 2010).

En nuestro país, se estima que entre 4 y 5% de los presupuestos de salud se gastan en enfermedades relacionadas con diabetes. En el 2008 datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en nuestro país indican que la tasa de incidencia de DM tipo 2 representó 371.55 personas por cada cien mil habitantes (Córdoba Villalobos *et al.*, 2008). La tasa de mortalidad aumentó en el periodo 2000 y 2007 de 77.9 a 89.2 por cada 100,000 habitantes, siendo las mujeres el género más vulnerable y la Ciudad de México la entidad federativa con mayor tasa de mortalidad por diabetes (Sánchez-Barriga, 2010). En el 2008 se registraron 60 mil muertes y 400,000 casos nuevos al año en nuestro país, por lo que la prevención y control de la diabetes representa un reto de salud pública para nuestro país, siendo ésta resultado de malos hábitos y sedentarismo sumados a la carga genética, el estrés psicosocial, tabaquismo y consumo excesivo de bebidas alcohólicas, los cuales constituyen los

principales determinantes que inciden en su desarrollo (Córdoba Villalobos *et al.*, 2008).

1.1 Diabetes Mellitus (DM)

La DM es un grupo de enfermedades de tipo metabólico caracterizado por un estado de hiperglucemia crónico como consecuencia de defectos en la acción y/o secreción de insulina, además de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. El estado de hiperglucemia a largo plazo está asociado con disfunción y fallas de varios órganos, especialmente ojos, riñón, nervios, corazón y vasos sanguíneos (ADA, 2011).

1.1.2 Tipos de DM

Con base fundamentalmente en su etiología y características fisiopatológicas, la DM se clasifica en cuatro tipos principales: tipo 1, tipo 2, otros tipos específicos y diabetes gestacional.

La diabetes tipo 1 (DT1), se caracteriza por carencia total de insulina debido a una alteración autoinmune que lleva a la destrucción de las células β del páncreas. La tasa de destrucción de la célula β es variable, siendo rápida en bebés y niños, y baja en adultos. Las primeras manifestaciones de este tipo de diabetes son la cetoacidosis o, en algunos casos, hiperglucemia en ayunas o ambas en caso de infección o estrés (ADA, 2011). El mecanismo que inicia el proceso de destrucción inmunológica progresiva e irreversible de las células β tiene algunas posibles teorías: una de ellas es que existen autoanticuerpos dirigidos de forma específica contra distintos componentes de las células β ; otra teoría establece que existen linfocitos T con una capacidad regulatoria disminuida; y por último contempla la implicación de algún virus del medio ambiente combinado con la disminuida expresión de enzimas antioxidantes

pancreáticas, que le confieren una baja resistencia contra agresiones oxidantes. Entre los autoantígenos se encuentran la insulina, descarboxilasa de ácido glutámico (GAD65), tirosinfosfato, antígenos de insulinoma (IA)-2 e IA-2 β , carboxipeptidasa H, antígeno de los islotes pancreáticos (ICA-69), gangliósidos GM, autoantígeno 38-kd y Sox-13 (Olvera-Granados *et al.*, 2008).

La patogénesis de la DT2, que representa del 90 a 95% de los casos de diabetes, comprende un cuadro que va desde resistencia a la insulina hasta una disminución en la secreción de dicha hormona. Un aumento en la secreción de la insulina se produce para mantener el metabolismo de la glucosa y superar la resistencia a la insulina en personas con tolerancia normal a la glucosa. La DT2 se produce como consecuencia de la disfunción progresiva de las células β , influyendo así en el metabolismo normal de la glucosa (Aschner y García de los Ríos, 2009; Jeong-Taek *et al.*, 2010). Algunos pacientes con este tipo de diabetes son obesos o presentan mayor porcentaje de grasa acumulada en la región abdominal, por lo que ambas condiciones causan resistencia a la insulina. El riesgo de padecer DT2 aumenta con la edad, con la obesidad y con la carencia de actividad física (ADA, 2011).

La diabetes gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo, que proporciona los umbrales para el diagnóstico de los valores elevados de glucosa en ayunas. La Asociación Internacional de Diabetes sugiere que todas las mujeres embarazadas sin diabetes deben realizarse una prueba de tolerancia la glucosa en la semana 24-28 de gestación. Este tipo de diabetes se relaciona con las malformaciones de los hijos, como resultado de la hiperglucemia preconcepcional o periconcepcional, además de

tener un riesgo mayor de desarrollar hipertensión, otras enfermedades cardiovasculares y diabetes en edad temprana (Vambergue y Fajardy, 2011).

Los otros tipos específicos pueden ser ocasionados por defectos genéticos en la función de las células β o en la acción de la insulina, por enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías inducidas por drogas o químicos, infecciones, formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente u otros síndromes genéticos asociados con diabetes (Aschner y García de los Ríos, 2009).

1.1.3 Complicaciones en la diabetes

A pesar de que la diabetes se ha catalogado como una enfermedad de origen endocrino, actualmente se puede observar que tiene manifestaciones y consecuencias vasculares, las cuales se dividen en dos grandes grupos: microvasculares y macrovasculares. Las primeras, afectan los capilares de calibre pequeño, entre las que destacan: nefropatía, que conduce a falla renal; retinopatía diabética con pérdida de la visión; y la neuropatía, con daños al sistema nervioso. Además, la neuropatía autonómica causa síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, así como disfunción sexual. Por otro lado, las macrovasculares afectan a capilares de mayor calibre, así como arterias de tamaño medio, dentro de las cuales se puede ubicar a la aterosclerosis, infarto del miocardio, accidentes vasculares encefálicos y lesiones de los vasos de los miembros inferiores (Mahía y Pérez, 2000).

Algunos mecanismos fisiológicos y bioquímicos implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes incluyen anomalías hematológicas que pueden conducir a deficiente oxigenación tisular, además de un incremento en la agregación eritrocitaria con aumento de la microviscosidad y deformabilidad, niveles

elevados de hemoglobina glicada (HbA1c) cuya afinidad por el oxígeno se ve alterada, anomalías de la función plaquetaria, incluyendo adhesividad aumentada y anomalías en proteínas plasmáticas (Arana y Domingo, 2001).

En fases más avanzadas de la enfermedad, la persistencia de estas alteraciones vasculares funcionales puede llevar a la aparición de alteraciones estructurales rápidamente irreversibles. Entre los mecanismos implicados en las complicaciones vasculares destaca la glicación de proteínas, debido a la capacidad de la glucosa y otros azúcares para formar uniones reversibles con grupos amino de las proteínas, lo que da lugar a la formación de bases de Schiff. La formación de estas bases es reversible y directamente proporcional a la concentración de glucosa en el medio; posteriormente la base de Schiff sufre una reestructuración y da lugar a un producto de Amadori, ambos se conocen como los productos tempranos e intermedios de la glicación. En las proteínas con una vida media larga, estos procesos de glicación progresan hasta dar lugar a los AGE, por sus siglas en inglés *advanced glycation end products*.

Otro mecanismo implicado es la vía de los radicales libres, aumentando la presencia de éstos y la depleción de sistemas antioxidantes en diabetes, dando como resultado una situación de estrés oxidativo y provocando una activación de mecanismos de daño vascular.

Otra vía involucrada es la vía del sorbitol y mioinositol en aquellos tejidos en los que la captación de glucosa no es dependiente de la insulina, como es el caso del riñón, el tejido nervioso y vascular, el cristalino, etc. La hiperglucemia determina un aumento de flujo de glucosa al interior celular; una parte de ésta es reducida a sorbitol por acción de la aldosa-reductasa y usa como cofactor el NADPH (nicotinamida

adenina dinucleótido en su forma reducida), teniendo diversas consecuencias: disminuyen los niveles de NADPH, con lo que se reduce la capacidad de defensa de la célula ante el estrés oxidativo, y la producción de NO (óxido nítrico). Además incrementa la relación NADH/NAD⁺, que a su vez provoca incremento en los niveles de triosa fosfato (agente de glicación muy reactivo) y diacilglicerol (activador endógeno de la proteincinasa C (PKC), y una disminución en la síntesis o transporte del mioinositol se traduce en una menor actividad de la ATPasa dependiente de Na⁺-K⁺ en la membrana plasmática celular, contribuyendo a la aparición de las alteraciones vasculares.

Por último tenemos la vía de la proteína cinasa C activada por la formación de diacilglicerol; esta cinasa actúa como inhibidor de la vía de señalización de la insulina, lo que afecta tanto al receptor de ésta como al transporte de glucosa, involucrada también en la disfunción endotelial, alteraciones en la contractilidad y permeabilidad vascular, los fenómenos de angiogénesis y cambios en la matriz extracelular, lo que finalmente conlleva al desarrollo de complicaciones crónicas de DM (Castro-Rodríguez y Rodríguez-Mañas, 2006).

Pacientes con DT2 tienen un incremento en la incidencia de aterosclerosis cardiovascular, enfermedad arterial periférica y cerebrovascular además de hipertensión y anormalidades en el metabolismo de proteínas (ADA, 2011).

1.2 El páncreas

El páncreas es un órgano derivado del endodermo dorsal y ventral, el primero constituye la mayor parte del páncreas (cabeza, cuerpo y cola), la parte ventral comprende la apófisis uncinada y parte de la cabeza del páncreas. El páncreas es una glándula mixta que contiene tejido exocrino conformado por células acinares

productoras de enzimas digestivas; también presenta un tejido endocrino compuesto por células de los islotes de Langerhans, que producen hormonas que participan en la homeostasis de la glucosa. Éstos representan alrededor de 1% del peso de la glándula. Las células de los islotes están delimitadas por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad. El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos (Olvera-Granados *et al.*, 2008).

El tejido endocrino está constituido por cuatro tipos celulares: las células β productoras de insulina que representan el 70%; las células alfa (α) productoras de glucagón que representan el 20%; las células delta (δ) productoras de somatostatina que representan entre el 5 a 10% y las células productoras del polipéptido pancreático (PP), que abarca el 2%. Existen algunos tipos celulares secundarios, las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP o células DI) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromáfines); otro tipo celular encontrado en la periferia del islote es el parecido a las células neuronales Schwann, ocupando menos del 1% y que podría estar implicado en la regeneración pancreática (Olvera-Granados *et al.*, 2008).

Las células β se localizan en agrupaciones conectadas por uniones estrechas (*tight junctions*) que permiten la secreción coordinada de insulina, con función fisiológica importante para asegurar que los niveles de glucosa circulante se mantengan dentro de estrechos márgenes fisiológicos. La insulina es una hormona polipeptídica, la cual transmite una señal anabólica una vez unida a su receptor, estimulando la captación de glucosa, aumenta la actividad de la enzima glucógeno sintasa, y por tanto la acumulación de glucógeno; aumenta la síntesis de proteínas,

así como la disminución de la lipólisis. Sin embargo en DM el páncreas disminuye la producción de insulina o, en la DT2, dicha hormona no es reconocida por sus receptores, desencadenando resistencia a la insulina.

1.2.1 Célula β pancreática

Una de las funciones fisiológicas más importantes de este tipo celular es la secreción de insulina, como un intento para mantener un estado normoglucémico ante niveles elevados de glucosa extracelulares; la activación de la secreción de esta hormona se presenta mediante un complejo entramado de nutrientes, hormonas y señales neuronales.

En condiciones normales, el funcionamiento de la célula β pancreática inicia cuando la glucosa estimula la secreción de insulina. La glucosa se introduce a la célula a través del transportador GLUT-2, para su posterior metabolismo, en donde la glucosa se fosforíla y aumentan las concentraciones de adenosín trifosfato (ATP). El metabolismo de la glucosa dentro de la célula β pancreática se traduce en un aumento de la relación ATP/ADP (adenosín difosfato) intracelular, con lo que se produce el cierre de canales de potasio (K^+) sensibles a ATP. A su vez, esto provoca un aumento en el potencial de membrana que lleva a la despolarización de la misma, ocasionando la apertura de canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de potencial de voltaje (VDCC). Finalmente, la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales es el estímulo directo para la secreción de gránulos de insulina preformados, a través de exocitosis (Jean-Sébastien *et al.*, 2009). La reducción y disfunción de células β y la insuficiencia de secreción de insulina trae consigo un déficit en los mecanismos de compensación de la célula, generando un estado de intolerancia a la glucosa y

resistencia a la insulina, los cuales son componentes centrales de la patogénesis de la DT2 (Kushner *et al*, 2005; Ji-Hyeon *et al.*, 2010).

1.2.2 Proliferación de la célula β pancreática

Se sabe que las células β adultas tienen una capacidad de proliferación limitada que depende de factores genéticos y, con la edad, dicha proliferación disminuye potencialmente. Recientes estudios sugieren dos posibles mecanismos de incremento de células β : uno por duplicación de células preexistentes y el otro por generación de células β a través del reclutamiento de células madre o progenitoras dentro del epitelio ductal pancreático (Ji-Hyeon *et al.*, 2010).

Bajo condiciones normales las células β tienen una baja capacidad de regeneración; sin embargo, tanto las células endocrinas como las exocrinas se pueden regenerar regulando la expresión de varios marcadores de proliferación, sugiriendo que los islotes y conductos pancreáticos de rata, como los del humano contienen células progenitoras. En el caso de las células acinares, que corresponden a las células exocrinas, pueden diferenciarse hacia células β (Olvera-Granados *et al.*, 2008). Uno de los marcadores de proliferación es nestina (proteína de filamentos intermedios que se ha identificado como un marcador de células madre tanto neuronales, como endocrinas), en estudios *in vitro* se ha encontrado la presencia de células positivas a esta proteína en los islotes pancreáticos, en el tejido exocrino, así como en el epitelio ductal, endotelio vascular, pericitos y en el mesénquima de la región pancreática (Ahlgren y Jonsson, 2001).

Las células β , siguen las distintas etapas del ciclo celular, el cual comprende dos etapas: la interfase y la división celular o mitosis (M); en la interfase se distinguen tres fases: la fase de crecimiento celular 1 (G1), la fase de síntesis (S) y la fase de

crecimiento celular 2 (G2). Mediante ensayos de proliferación con timidina tritiada de islotes en cultivo sincronizados con hidroxiaurea, se llegó a la conclusión que el ciclo celular de este tipo celular era de 14.9 h (2.5 h de la fase G1, 6.4 h en la fase S, 5.5 h en G2 y 0.5 h en la fase M), además de que se observó que la progresión del ciclo celular no cambia a distintas concentraciones de glucosa (Swenne, 1982). El crecimiento de la masa celular β viene determinado por el número de células que entran en ciclo y no por el aumento de la velocidad del ciclo. La célula termina un ciclo a una velocidad bastante elevada; sin embargo, el número de células en ciclo es muy bajo, sólo un 3% del total de la masa se replica en edad adulta, frente a un 10% en estado fetal. A pesar de esto existe un reservorio de células en fase Go (estado quiescente o de reposo) susceptibles de entrar en ciclo y que podrían aumentar el número de células en ciclo si son requeridas, indicando que la mayoría de células β no están en un estado Go irreversible. Por otro lado, en la etapa fetal inicial la célula β exhibe una baja respuesta replicativa a la glucosa, mientras que en fase tardía de la etapa fetal, la glucosa es un estímulo muy potente para la replicación de la célula β y estimula también la entrada de esta célula al ciclo de la fase Go (Rane y Reddy, 2000).

La proliferación de las células del islote pancreático está íntimamente regulada a nivel de la fase G1 del ciclo celular por la inactivación de p53 y la proteína de retinoblastoma (pRb) a través de la sobreexpresión del antígeno-T de cadena larga del virus SV40, conocido por promover proliferación por inactivación de p53 y pRb, provocando además aumento de la proliferación de la célula β e hiperplasia de islotes pancreáticos, derivado en el desarrollo de insulinomas (Hanahan, 1985).

1.2.3 Ciclo celular de la célula β pancreática

La maquinaria del ciclo celular recibe señales enviadas por varias vías a través de factores de crecimiento y mediante moléculas que regulan procesos de quiescencia celular, proliferación, diferenciación, senescencia y apoptosis (Ji-Hyeon *et al.*, 2010). Tanto el crecimiento, la diferenciación y la proliferación se encuentran regulados por diferentes factores, entre ellos varios complejos de cinasas, que gobiernan las señales estimuladoras del crecimiento, contienen subunidades reguladoras denominadas ciclinas β y una subunidad catalítica denominadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Hino *et al.*, 2004). Las CDKs son una familia de proteínas cinasas serina-treonina que fosforilan a sustratos implicados principalmente en la progresión y transcripción del ciclo celular de la célula β pancreática (Fajas *et al.*, 2010).

El nivel de expresión de las ciclinas y el grado de fosforilación de las CDKs, controlan su actividad enzimática. Para mantener el orden temporal de las distintas fases del ciclo celular, los complejos ciclina-CDK deben actuar solamente en unos puntos específicos. Durante la fase G1 se expresan la ciclina D y E, que son las encargadas de iniciar el ciclo. En respuesta a señales mitogénicas, el complejo de ciclina D/CDK4 (cinasa tipo 4 dependiente de ciclina), es fosforilado en la serina 780 (Ser780). Las ciclinas D/CDK6 (cinasa tipo 6 dependiente de ciclina) y ciclina E/CDK2 (cinasa tipo 2 dependiente de ciclina) fosforilan a pRB, la cual regula negativamente la transición de la fase celular G1 a la fase S de la célula β . Esta se encuentra asociada a un factor de transcripción E2F1, que a su vez se encuentra organizado en heterodímeros con DP (por sus siglas en inglés *differentiation regulated transcription factor* (DRTF) *protein*), o bien, asociado con complejos que contienen los miembros

de la misma proteína (p107, p130) y de la familia a de proteínas CDK4 (Jean-Sébastien *et al.*, 2009). Las CDK's promueven la progresión de la fase S y de la mitosis (M) a través de la fosforilación y, por tanto, inactivación de la pRB (Ji-Hyeon *et al.*, 2010). Las células β pancreáticas que se encuentran en estado no proliferativo pueden entrar en un estado de proliferación a través de la vía CDK4-PRB-E2F1, la cual regula el ciclo celular y se encuentra implicada en funciones celulares vitales, como el metabolismo celular y la homeostasis de la glucosa (Jean-Sébastien *et al.*, 2009). Por su parte E2F1 es considerada una molécula fundamental en la secreción de insulina, ya que regula directamente la expresión de los canales de K^+ dependiente de ATP (K_{ATP}), los cuales están formados por la asociación heteromérica del receptor 1 de sulfonilurea (SUR1) con el canal de K_{ATP} activo, o kir6.2 (por sus siglas en inglés *inwardly rectifying potassium*; este canal es esencial en la regulación de la secreción de la insulina estimulada por glucosa en la célula β (Jean-Sébastien *et al.*, 2009).

En condiciones de hipoglucemia, como en el ayuno, el gen que codifica a kir6.2 se encuentra inhibido, debido a la unión de E2F1, DP-1 y pRB. Mientras que en condiciones de hiperglucemia, la insulina es secretada a través de un efecto autocrino de las células β pancreáticas, llevándose a cabo la activación de fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K), y por consiguiente un aumento de la actividad de CDK4, la fosforilación de pRB y posteriormente la actividad transcripcional de E2F1. Por lo tanto, niveles elevados de glucosa promueven la activación de la transcripción del gen E2F1 y, por consiguiente, se estimula la regulación de Kir6.2. Así, CDK4 se activa bajo niveles elevados de glucosa a través de la vía de señalización de la insulina, resultando en una activación de E2F1 y por consiguiente un aumento de expresión de Kir 6.2 (Jean-

Sébastien *et al.*, 2009). CDK4 representa uno de los marcadores de proliferación más importantes de células β pancreática.

Recientes estudios demostraron que CDK4 tiene influencia en la regulación del tamaño de la masa celular β pancreática. La depleción de CDK4 se manifiesta en hipoplasia y desarrollo de diabetes, mientras que la sobreexpresión genera hiperplasia; ambos eventos fueron observados en un modelo murino (Hino *et al.*, 2004). En etapas tardías de la fase G1, la CDK2 se une a la ciclina E formando un complejo que colaborará con el complejo ciclina D-CDK4 para la completa fosforilación de pRB. El complejo ciclina E-CDK es esencial para el inicio de la replicación del ADN en la fase S. Una vez iniciada la fase S la ciclina E se degrada y es sustituida por la ciclina A. El complejo ciclina A-CDK2 desempeña una función importante durante la fase la síntesis del material genético; tanto la ciclina A como B son mitóticas. La CDK1 forma un complejo con la ciclina B1, el cual es activado al final de la fase S, y conduce a que la célula entre en mitosis evento en el que también participa la ciclina A (Hino *et al.*, 2004).

Sin embargo la actividad de CDKs está regulada negativamente por inhibidores de cinasas tipo 4 (INK4), Cip (inhibidor que interacciona con proteínas CDK) y Kip (proteína cinasa inhibidora), dichos inhibidores juegan un papel central como señales inhibitoras del crecimiento celular, ya que se unen al complejo ciclina/CDK e inhiben su actividad catalítica, así regulando negativamente la progresión del ciclo celular. Los inhibidores de CDKs se clasifican en dos familias basadas en su homología funcional y estructural:

1. La familia de INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}) que se unen específicamente a CDK4 y CDK6 y previenen su interacción con las ciclinas de tipo D.

2. La familia Cip/Kip está compuesta por p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} y tiene un alto perfil inhibitorio, bloqueando las actividades de las ciclina D, E y A (Hino *et al.*, 2004).

1.3. Tratamiento de DM

El tratamiento de la DM está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y prevenir el desarrollo de complicaciones agudas y crónicas; las recomendaciones dietéticas en DT2 incluyen un porcentaje de carbohidratos de aproximadamente el 50% de la ingesta calórica diaria, proteínas 10- 20%, grasas 10-20%. Menos del 10% de estas calorías deben ser grasas saturadas, y menor o igual al 10% de grasas poliinsaturadas, con menos de 300 mg de colesterol, 25-35 g de fibra y no más de 3 g de sodio/día. Además, la recomendación de hacer ejercicio físico en la diabetes busca mejorar el metabolismo de carbohidratos y la sensibilidad a la insulina (ADA, 2011).

Los individuos con DT2 no dependen de la insulina exógena para el control adecuado de la glucemia. Sin embargo, pueden llegar a requerirla si la dieta o los hipoglucemiantes orales no brindan los resultados esperados sobre la glucemia.

Así, para el control de la DT2 se utilizan varios fármacos hipoglucemiantes, principalmente biguanidas, tiazolidinedionas (TZDs), sulfonilureas e incretinas (Alberti *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que las incretinas como el GIP (polipéptido inhibidor gástrico) y el GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón) son proteínas que se secretan en el tracto gastrointestinal, después del consumo oral de alimentos ricos en carbohidratos y grasas; ambas moléculas se unen a sus receptores y son degradadas por la enzima DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV). Uno de los fármacos inhibidores de DPP4

comúnmente utilizados para el control de DT2 es sitagliptina, el cual tiene efecto antihiper glucémico al inhibir a DPP-IV, aumenta en los niveles de GIP y GLP-1, y se ha reportado que las incretinas aumentan los niveles plasmáticos de insulina y tienen efecto sobre la proliferación de células β pancreáticas en cultivos celulares. Por lo anterior, este tipo de fármacos ha mostrado resultados excelentes sobre la hiper glucemia. Sin embargo, algunos individuos no responden de manera homogénea ante la administración de éstos e inclusive en algunos casos producen fatiga pancreática, conduciendo al paciente a tomar medidas de remplazo hormonal (Arechavaleta, 2006; Kim y Egan, 2008).

Es claro que el día de hoy no se ha encontrado un tratamiento adecuado para el control de la glucemia y menos para regular el perfil inflamatorio alterado que conduzca a un descenso en el desarrollo de complicaciones vasculares. Por tal motivo, surge la necesidad de investigar nuevas fuentes potenciales de sustancias capaces de regular el metabolismo de la glucosa y el perfil inflamatorio, retrasando el desarrollo de complicaciones vasculares sin fatigar la funcionalidad pancreática. Por el contrario, se busca que induzcan proliferación celular, en particular de la célula β , como una manifestación de la regeneración pancreática que podría contribuir a un mejor control fisiológico de la glucemia.

2. Antecedentes

Aunque el uso clínico de los fármacos mencionados es amplio, la población también utiliza numerosas plantas medicinales que acompañan el tratamiento de la diabetes. Se tienen reportes del uso de más de 350 plantas mexicanas para el control empírico de la DT2 (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

En México durante mucho tiempo se han utilizado plantas medicinales de manera empírica con diferentes efectos farmacológicos (Alarcón–Aguilar, *et al.*, 2002). Una de estas plantas es *Cucurbita ficifolia* Bouché, conocida y cultivada en México como “chilacayote”. Se le han dado diferentes usos: con el fruto inmaduro se preparan diversos platillos para el consumo humano, mientras que con el fruto maduro se prepara un dulce cristalizado. El fruto maduro de *C. ficifolia* es similar a una pequeña calabaza blanca que mide de 8 a 10 cm de diámetro; tiene una delgada cáscara verde, con manchas blancas. Así mismo, la población le ha atribuido ciertas características curativas en heridas, hemorroides, fiebre, dolores y en desórdenes inflamatorios, así como para el control de la diabetes. *C. ficifolia* ha mostrado actividad hipoglucemiante en diversas condiciones experimentales (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002).

La actividad hipoglucemiante del fruto de *C. ficifolia* ha sido estudiada a nivel experimental en ratas, ratones y conejos. En conejos con diabetes experimental moderada (glucemias entre 150-300 mg/dL) y diabetes experimental severa (glucemia mayor a 300 mg/dL), inducida por administración de aloxana a diferentes dosis; la administración del jugo del fruto de *C. ficifolia* (4 ml/kg) redujo la glucemia únicamente en los conejos con diabetes moderada (Román-Ramos *et al.*, 1992).

En estudios realizados en ratones sanos para observar el efecto de la administración de diferentes dosis (125, 250, 500, 594.49, 750, 1000 y 1250 mg/kg) del jugo de *C. ficifolia* por vía intraperitoneal y oral, se observó efecto hipoglucémico por ambas vías; además, las dosis de 750 a 1250 mg/kg indujeron de manera dosis dependiente la muerte de los ratones. En otro estudio, la administración diaria por vía

oral del jugo de *C. ficifolia* por 14 días a ratas tratadas con aloxana produjo una disminución significativa de la glucemia (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002).

También se han realizado estudios de toxicología aguda con el jugo liofilizado de *C. ficifolia* en ratones, reportándose una dosis letal 50 (DL₅₀) por vía intraperitoneal de 625 mg/kg y por vía oral de 3689 mg/kg (Hernández *et al.*, 2002), los estudios se continuaron con una dosis de 200 mg/kg por vía oral, con un índice terapéutico de 18.4. En pacientes diabéticos con glucemias entre 150-300 mg/dL también se ha demostrado el efecto hipoglucémico de *C. ficifolia* (4 ml/kg), al monitorear las glucemias por 5 h, se observó su disminución después de 3 h de haber sido ingerido el extracto (Acosta *et al.*, 2001).

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

Xia y Wang aislaron un compuesto a partir del extracto metanólico de *C. ficifolia*, el D-qui-ro-inositol (DQI), el cual mostró efecto hipoglucémico en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ); sin embargo, el rendimiento fue muy pequeño. También se administró un extracto de *C. ficifolia* durante 30 días por vía oral, que contenía 10 a 20 mg de DQI por cada kg del peso del animal, incrementó los niveles de glucógeno hepático, hemoglobina total, niveles de insulina y disminuyó los niveles de glucosa (Xia y Wang, 2006).

En estudios recientes se ha determinado que la administración de *C. ficifolia* (200 mg/kg) disminuye los niveles de malondialdehído (producto de lipoperoxidación) y aumenta el glutatión reducido (antioxidante endógeno) en hígado de ratones diabéticos. A esta misma dosis, *C. ficifolia* disminuye los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e incrementa interferón gamma (IFN- γ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) en plasma de ratones con diabetes inducida con estreptozotocina (Román-Ramos *et al.*, 2012). Así mismo, en el laboratorio de farmacología de la UAM-I se ha determinó que, a la misma dosis, *C. ficifolia* aumenta la expresión de receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR α) y disminuye la expresión de PPAR γ en hígado de ratones con diabetes inducida con STZ, lo cual se correlaciona con un descenso en los niveles de triglicéridos circulantes; sin embargo, el efecto del extracto no es aumentar el número de transportadores GLUT 1 ni GLUT 4, tal como lo hacen las tiazolidinedionas (Ramírez-Luna, 2011).

Por otro lado, se evaluó el efecto de la administración de un extracto acuoso de *C. ficifolia* (1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en músculo liso vascular, el cual no bloqueó los

canales de K⁺ dependientes de ATP, por lo que el efecto de *C. ficifolia* no parece ser un secretagogo de insulina como las sulfonilureas (Banderas-Dorantes, 2011).

En estudios histológicos recientes en ratones con diabetes experimental inducida con STZ que fueron tratados con *C. ficifolia*, se observó en páncreas una mayor densidad celular aparente en los islotes pancreáticos respecto al control sano; mientras que el grupo diabético mostró un aspecto disgregado y fibrótico, incipiente de islotes pancreáticos, similar al mostrado en el control positivo (grupo diabético tratado con pioglitazona) (Figura 1); en cuanto a la histología de corazón, riñón e hígado, los ratones tratados con *C. ficifolia* y pioglitazona mostraron respuesta macrofágica en vasos sanguíneos (García-González, 2009).

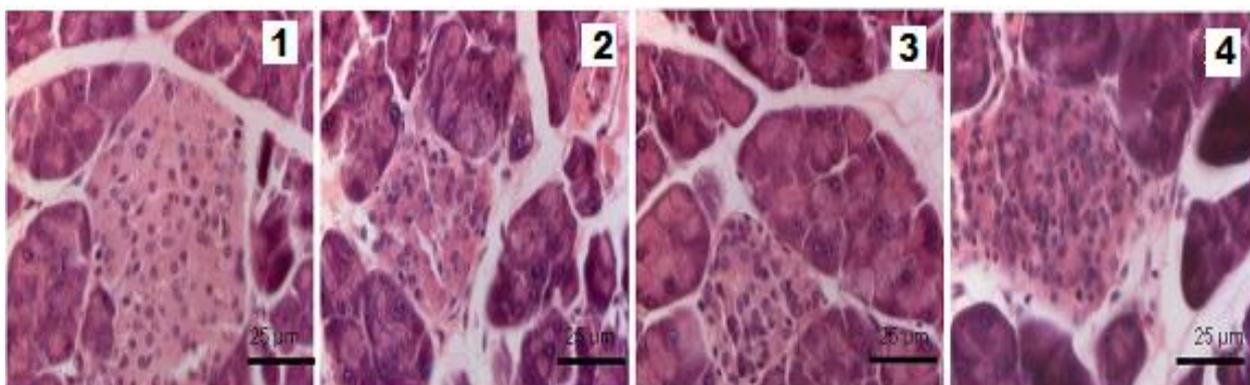


Figura 1. Fotomicrografías de cortes longitudinales de páncreas de ratones diabéticos sometidos a diferentes tratamientos en un estudio farmacológico crónico, teñidos con H-E, aumento original x400. **1.** Sano; **2.** Diabético tratado con SSI durante 45 días; **3.** Diabético tratado con pioglitazona durante 45 días; **4.** Diabético tratado con *C. ficifolia* durante 45 días.

Estas evidencias sugieren que *C. ficifolia* podría estar induciendo regeneración de las células insulares. Sin embargo, es necesario confirmar estas observaciones a través de estudios cuantitativos, que puede realizarse por medio marcadores de proliferación característicos de células β pancreáticas. Así mismo, es necesario determinar los efectos citotóxicos potenciales que parecen sugerir los estudios

toxicológicos previos. Esto es importante debido a que la ingestión continua del extracto acuoso del fruto maduro de *C. ficifolia* podría generar alteraciones sobre los principales órganos asociados con complicaciones de la DM, específicamente hígado, riñón y páncreas.

3. Justificación

La DM representa uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial. Se trata de una enfermedad crónico-degenerativa con complicaciones fatales e inevitables que afectan de manera grave a la economía nacional. En la actualidad se carece de un tratamiento eficaz que, sobre todo, disminuya el riesgo de desarrollar complicaciones vasculares, lo cual justifica la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento.

La mayoría de los pacientes diabéticos recurre al uso empírico de plantas medicinales, ya sea como única alternativa terapéutica o como complemento de la medicina convencional. Sin embargo, el uso de las plantas medicinales, en la mayoría de los casos, aún no cuenta con una validación científica apropiada y su uso conlleva la posibilidad de ingerir mezclas de compuestos con diversos efectos terapéuticos, así como con efectos adversos.

Actualmente se cuenta con evidencias experimentales que apoyan la idea de que *C. ficifolia* contiene sustancias con efecto hipoglucémico, antioxidante y antiinflamatorio. Entre las sustancias más importantes que se han propuesto como responsables de estas acciones está el DQI, compuestos polifenólicos y cucurbitanos. La toxicidad aguda del fruto de *C. ficifolia* también fue estudiado, clasificándose como un preparado moderadamente tóxico. Así mismo, los resultados de estudios morfológicos preliminares en ratones diabéticos permiten sugerir que *C. ficifolia* podría

incrementar la densidad celular de los islotes pancreáticos. En estos estudios también se han detectado cambios en la morfología celular de varios órganos. Por lo tanto, es necesario confirmar dichos eventos a través de la cuantificación de marcadores de proliferación pancreática como: CDK4, así como evaluar los efectos de *C. ficifolia* sobre la histología de hígado y riñón.

4. Hipótesis

Si *C. ficifolia* incrementa la proliferación de las células β pancreáticas, entonces aumentará las concentraciones intracelulares de CDK4 y la producción de insulina, mejorando el estado general de ratones diabéticos, sin alterar la arquitectura histológica de páncreas, hígado y riñones de ratones diabéticos.

5. Objetivo General

Determinar el efecto de *C. ficifolia* sobre la proliferación de células β pancreáticas en ratones diabéticos y sus efectos sobre la arquitectura histológica hepática y renal.

6. Objetivos particulares

6.1 Obtener y caracterizar químicamente un extracto acuoso del fruto maduro de *C. ficifolia* (colecta 2010).

6.2 Corroborar el efecto hipoglucémico del extracto acuoso caracterizado.

6.3 Cuantificar las modificaciones histológicas sobre los islotes pancreáticos de ratones diabéticos tratados con *C. ficifolia*.

6.4 Evaluar la influencia de *C. ficifolia* sobre CDK4 en cortes de páncreas de ratones diabéticos.

6.5 Evaluar la influencia de *C. ficifolia* sobre la morfología de hígado y riñón de ratones diabéticos.

6.6 Evaluar la influencia de *C. ficifolia* sobre los niveles séricos de insulina de ratones diabéticos tratados con *C. ficifolia*.

7. Metodología

7.1 Material vegetal.

El fruto maduro de *Cucurbita ficifolia* Bouché se colectó en el municipio de Acolman, Estado de México (septiembre 2010). La identificación taxonómica se hizo por medio del cotejo de las hojas de la planta colectada con ejemplares del herbario de plantas medicinales del IMSS (Herbario-IMSSM).

7.2 Obtención del extracto acuoso

El extracto acuoso de *C. ficifolia* se obtuvo a partir del fruto maduro (diámetro del fruto: 21.5 cm; longitud de la semilla: 1.6 cm) libre de cáscara y semillas. El endocarpio resultante se cortó en rebanadas delgadas, se colocó en un recipiente para su deshidratación a temperatura ambiente con aireación constante y, una vez seco el material se trituró en un molino eléctrico tipo Wiley, modelo 4, usando una rejilla metálica de 1 mm de diámetro. Se tomaron 100 g del fruto seco de *C. ficifolia* y se maceraron con agua (1 L) durante 72 horas, dentro de una campana de flujo laminar con aireación constante. Cada 24 horas se recuperó la fase acuosa, la cual fue liofilizada (8 h/día). El producto resultante, con rendimiento del 5%, fue utilizado en los experimentos utilizando como vehículo solución salina.

7.3 Análisis fitoquímico del extracto de *Cucurbita ficifolia*.

El análisis fitoquímico del extracto de *C. ficifolia* se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), que consiste en un módulo de separación Waters 2695 con un detector de índice de refracción Waters 2697.

Para la detección del contenido de DQI se usó una columna LiChrospher amino (NH₂) 5µm (4 x 250mm, 100 A°), la fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo (CH₃CN) y agua en una proporción 90:10, con un flujo de 1 ml/min durante 10 minutos. La curva estándar se preparó con 4 concentraciones ascendentes (50, 100, 200 y 400 mg/ml). El estándar de DQI fue inyectado con el mismo sistema de HPLC.

Se realizaron pruebas fitoquímicas dirigidas a determinar el contenido de ácido cumárico, catequina y ácido gálico en el extracto. Utilizando una columna Alltima HP C-18 HL 3µm, la fase móvil consistió en metanol/acetonitrilo gradiente (50:50 – 40:60) con un flujo de 0.3 mL/min. La curva estándar se preparó con 6 concentraciones ascendentes (25, 50, 100, 200, 500 y 1000 mg/ml). El estándar de cada compuesto fue inyectado con el mismo sistema de HPLC.

7.4 Animales de experimentación.

Se usaron ratones *Mus musculus*, cepa CD-1, machos (30-35 g), del bioterio de la UAM Iztapalapa, mantenidos con una dieta básica para roedores y ciclo de luz/oscuridad por 12 horas.

7.5 Evaluación del efecto hipoglucémico del extracto de *C. ficifolia*. Tratamiento agudo

Para evaluar el efecto hipoglucémico del extracto de *C. ficifolia* se formaron 3 grupos de ratones normoglucémicos, con un tamaño de muestra de 5 animales por grupo. Después de un ayuno de 12 horas, los ratones se sometieron a los siguientes tratamientos: el grupo 1 recibió 4 ml/kg de solución salina isotónica; el grupo 2 recibió una dosis de 200 mg/kg (en base a DQI) de *C. ficifolia* con un contenido de DQI de 0.664 mg; el grupo 3 recibió sitagliptina (1.43 mg/kg), todos por vía intragástrica.

Después de la administración de los tratamientos se registraron las glucemias a diferentes intervalos de tiempo. Se realizaron 5 experimentos independientes (n=5).

7.6 Estudio farmacológico. Tratamiento subcrónico

Se formaron 4 grupos para el ensayo biológico con 10 animales cada grupo: el grupo 1 recibió 4 ml/kg de solución salina isotónica (control normoglucémico); el grupo 2 recibió 4 ml/kg de solución salina (control negativo), el grupo 3 recibió una dosis de 200 mg/kg del extracto acuoso de *C. ficifolia* (en base a 0.664 mg de DQI); y el grupo 4 recibió tratamiento de sitagliptina (1.43 mg/kg), todos por vía intragástrica. Después de la administración diaria de estos tratamientos por 15 días, se indujo diabetes experimental a los grupos 2, 3 y 4 mediante la administración intraperitoneal de STZ en dosis única (150 mg/kg), disuelta en buffer de citrato de sodio (Na⁺) 0.1 M (pH 4.5), y se continuó con la administración del extracto por 30 días más.

7.7 Cuantificación de los parámetros bioquímicos.

Se cuantificaron los siguientes parámetros bioquímicos a partir de muestras de sangre obtenidas del seno orbital del ojo del ratón: glucosa, transaminasa glutámico pirúvica (GPT), transaminasa glutámico oxaloacética (GOT) y triglicéridos en sangre.

La cuantificación de glucosa se basó en la medición de corriente eléctrica (Amperes) generada por la conversión de glucosa en gluconolactona por la enzima glucosa deshidrogenasa (*Accu-Check Sensor Comfort*).

La determinación cuantitativa de triglicéridos, GPT y GOT se realizó mediante el sistema Reflotron Plus de *Roche Diagnostics*. Esta técnica se basa en una reacción enzimática a través de diferentes fases de reacción, produciendo la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual se oxida bajo efecto catalítico de la enzima

peroxidasa, produciendo agua, la cual reacciona con un colorante azul (indicador redox) y se mide a 642 nm a 37°C.

Estos parámetros se cuantificaron a diferentes intervalos de tiempo (al inicio y a los días 15, 23 y 45) después del tratamiento con *C. ficifolia*.

7.8 Cuantificación de las concentraciones de insulina.

La concentración de este parámetro se determinó tanto en estudios con la administración aguda como a diferentes intervalos de tiempo durante la administración diaria (subcrónica) del extracto de *C. ficifolia*. El estudio por administración aguda del extracto por vía intragástrica se realizó en dos lotes: un lote de ratones normoglucémicos y otro de ratones hiperglucémicos (glucemias entre 200-500 mg/dL). Para ambos lotes se formaron 3 grupos con 5 animales cada uno: el grupo 1 recibió 4 ml/kg de solución salina isotónica; el grupo 2 recibió una dosis de 200 mg/kg de *C. ficifolia*; el grupo 3 recibió 1.43 mg/kg de sitagliptina. Se obtuvo sangre por el seno orbital del ojo del ratón en los minutos 30 y 60; y en el estudio con administración diaria, al inicio del tratamiento (T=0), a 15 y a los 45 días.

La insulina se cuantificó por el método de ELISA siguiendo las instrucciones del proveedor (*Lynco Research*). Esta técnica se basa en la formación de un complejo formado por la proteína de interés que se une a un anticuerpo monoclonal previamente adherido en una placa de 96 pozos; posteriormente se le une un segundo anticuerpo que está acoplado a la enzima peroxidasa de rábano y finalmente al reaccionar con un sustrato libera un producto colorido. La actividad enzimática es medida en un espectrofotómetro a dos longitudes de onda (450 nm y 590). La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína.

7.9 Obtención y fijación del material histológico.

Los órganos considerados para el estudio histológico se obtuvieron al inicio (T=0), a los 15 días y al final del tratamiento subcrónico (45 días) en los cuatro grupos de ratones. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (27.5mg/kg) vía intraperitoneal y se sacrificaron de manera unitaria de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1995). Se extrajeron los siguientes órganos: páncreas hígado y riñón, los cuales se fijaron con paraformaldehído (0.1 M) al 40% en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2-7.4) por 18 a 24 h para realizar las tinciones con Hematoxilina de Harris-Eosina amarillenta (H-E), ácido periódico de Schiff (PAS), y para inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CDK4. Una vez obtenidas las muestras, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (monosódico y disódico), tres veces por 15 minutos hasta eliminar por completo el fijador; posteriormente se hicieron tres lavados con etanol (50, 60 y 70° Gay Lussac (GL)) por 30 min cada uno y se conservaron a 4°C para someterlos a un procesamiento histológico automatizado con el TP1020 (Leica), iniciando la deshidratación con etanol gradual de 80, tres pasos de 96 y tres de 100° GL, 60 minutos cada uno. Enseguida, las muestras se aclararon con etanol-xileno 1:1 y xileno al 100° GL, dos veces por 50 minutos cada uno, se incluyeron con Paraplast Plus con DMSO en escuadras de Leuckart y se realizaron cortes histológicos seriados de 7 y 5 µm en plano sagital y/o longitudinal, dependiendo del tipo de tejido.

7.10 Tinción H-E.

Los tejidos se sometieron a tinción de H-E y se realizó mediante el siguiente esquema: Las muestras fueron tratadas con Neoclear por 5 minutos (dos repeticiones), etanol al 100° GL por 5 minutos (dos repeticiones), etanol-éter al 100°

GL con proporción 1:1 por 2 minutos, etanol al 96° GL por 2 minutos, etanol al 60° GL por 2 minutos, una vez con agua destilada, teñir con hematoxilina por 4 minutos, lavar una vez con agua corriente, etanol al 70° GL y ácido clorhídrico; lavar con agua destilada, mantener en solución Scott por 8 minutos, hacer un lavado con agua destilada, teñir con eosina por 3 minutos, lavar con agua destilada, etanol al 96° GL, etanol al 100° GL, etanol-xileno 1:1, xileno (dos repeticiones) y enseguida se montaron con entellan, cubriendo con un portaobjetos (Presnell y Schreibcam, 1997). Una vez que se montaron todas las laminillas, se realizó el análisis de las muestras en el microscopio Axioskope II (Carl Zeiss) y el analizador de imágenes de campo claro (Axiovision 4.5, Carl Zeiss). La digitalización de las fotomicrografías se tomaron con una cámara AxioCamMRc5 (Carl Zeiss).

7.11 Tinción de PAS en hígado.

Esta técnica histoquímica identifica hidratos de carbono y compuestos relacionados, dentro de los que destaca el glucógeno (Torres Seco, 2002). La técnica se realizó mediante el siguiente esquema de tinción: el tejido se desparafinó e hidrató hasta llegar a agua destilada, el tejido se oxidó en la solución de ácido periódico durante 5 minutos, se enjuagó con agua destilada, se colocó en el reactivo de Schiff de Coleman durante 5 minutos, se lavó con agua corriente tibia durante 10 minutos, el tejido se contrastó con la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos, se lavó con agua corriente durante 15 minutos, después se deshidrató y aclaró con etanol al 95° GL, etanol al 100° GL y xileno, 2 cambios de 2 minutos cada uno, y finalmente se montaron las laminillas con entellan. El glucógeno en hígado se tiñó de color rosa intenso (Prophet *et al.*, 1995).

7.12 Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CDK4.

Una vez incluidos los órganos en los bloques con Paraplast Plus se obtuvieron cortes de 5 μm de espesor, con una periodicidad de entre 500–600 μm ya que fueron regiones morfológicas equiparables para someterlos al procedimiento inmunohistoquímico; los cortes histológicos se colocaron en portaobjetos electrocargados (*Fisher Scientific*), una vez obtenidas las laminillas se eliminó la parafina por calentamiento durante 30 min en la estufa a 60°C, posteriormente se sometieron a un proceso de desparafinado e hidratación en xileno dos veces por 5 minutos, etanol –xileno por 5 minutos, etanol al 100° GL por 5 minutos (dos veces), etanol al 96° GL por 5 minutos (dos veces), etanol al 70° GL por 5 minutos y agua destilada 5 minutos. Para la unión de los anticuerpos anti-CDK4, se siguieron las instrucciones del proveedor Abcam.

La metodología incluyó el siguiente procedimiento: se sometieron las laminillas en una olla de presión (*2100 Retriever de Prestige Medical*) para desenmascarar el antígeno con buffer de citratos a pH 6.0, se sacaron las laminillas dejándose enfriar por 20 minutos, se realizó un lavado con agua destilada, se les aplicó peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos, se adicionó Tween 20 al 0.1% en PBS a temperatura ambiente dos veces, cubriendo cada sección del tejido. Posteriormente se eliminó cualquier exceso de buffer para delimitar el área del tejido con un lápiz hidrofóbico (liquid blocker pan pen de *Electron Microscopy Sciences*), evitando que se secase el tejido las laminillas se mantuvieron en una cámara húmeda, posteriormente se les adicionó el agente prebloqueador (preimmune de *Dako*) a todo el tejido durante 6 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se eliminó el exceso del prebloqueador y se cubrieron las laminillas con el anticuerpo primario (anti-CDK4 del

proveedor Abcam con una dilución 1:40) utilizando como control positivo un corte de piel de rata y como control negativo este mismo tejido sin agregar el anticuerpo primario, agregando en su lugar Tween 20 al 0.1% en PBS, las laminillas se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos en la cámara húmeda. Se sacaron las laminillas de la cámara de incubación y se lavaron 2 veces con Tween 20 al 0.1% en PBS para eliminar el anticuerpo primario. Se agregó un polímero 1 (de *Dako*) por 20 minutos en la cámara húmeda y se lavaron las laminillas en dos ocasiones con Tween 20 al 0.1% en PBS, se agregó el polímero 2 (de *Dako*) por 20 min en la cámara húmeda; acabado el tiempo se llevaron a cabo dos lavados con PBS-Tween 20 al 0.1%. Después se sacaron las laminillas de la cámara húmeda para agregarles el cromógeno recién preparado (diaminobencidina (DAB) con un amortiguador de sustrato de *Dako*) por 30 a 60 segundos. El desarrollo de la tinción se supervisó por inspección visual de la pigmentación. Se lavaron las laminillas con Tween 20 al 0.1% en PBS y con agua destilada para eliminar el cromógeno y se contrastaron los núcleos del tejido con hematoxilina por 2 minutos; posteriormente se realizó un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de hematoxilina y se prosiguió a realizar lavados con el tren de deshidratación antes descrito en sentido inverso; una vez llegando a xileno se montaron las laminillas con entellan (Presnell y Schreibcam, 1997).

7.13 Análisis histológico

En el caso de páncreas, las muestras histológicas se analizaron por individuo a razón de siete cortes de 5 μm de espesor por órgano en regiones morfológicas equiparables. Se revisaron 20 campos de 3.24 mm^2 por muestra a 100 y 400 aumentos totales por órgano, teñidos con H-E para cuantificar el número, tamaño y

área de islotes pancreáticos, usando un microscopio Olympus con una cámara Infinity 1 U-TV 1x-2 con el objetivo de 10X en el programa infinity 1-2C 18.

El análisis de células inmunoteñidas con el anticuerpo anti-CDK4 se realizó con el programa del analizador de imágenes AxioVision Rel 4.8 (*Zeiss Software Inc*), mismo que se usó para hígado y riñón, analizando 6 cortes por órgano de 7 µm de grosor con densidades entre 500–600 µm.

8. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y utilizando como prueba complementaria Tukey-Kramer para evaluar las diferencias entre grupos, con un intervalo de confianza del 95%, mediante el paquete estadístico NCSS 2000.

9. Resultados

9.1 Rendimiento y caracterización del extracto de *C. ficifolia*.

Se preparó el extracto acuoso de *C. ficifolia*, obteniendo un rendimiento de 1.82 gramos por 3,077 kg.

El análisis fitoquímico del extracto arrojó 3.32 mg de D-qui-ro-inositol y 7.47 mg de ácido gálico por g de extracto. El extracto no contuvo ácido cumárico ni catequina.

9.2 Efecto de *C. ficifolia* sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa.

El extracto acuso de *C. ficifolia* redujo significativamente la glucemia a los minutos 240 y 360 después de haberlo administrado, respecto al control y en relación con su glucemia inicial. La sitagliptina redujo los niveles de la glucemia al minuto 120, con respecto al control y a su valor inicial (Figura 2). Esto demuestra que tanto el extracto como el control positivo tienen un efecto hipoglucémico.

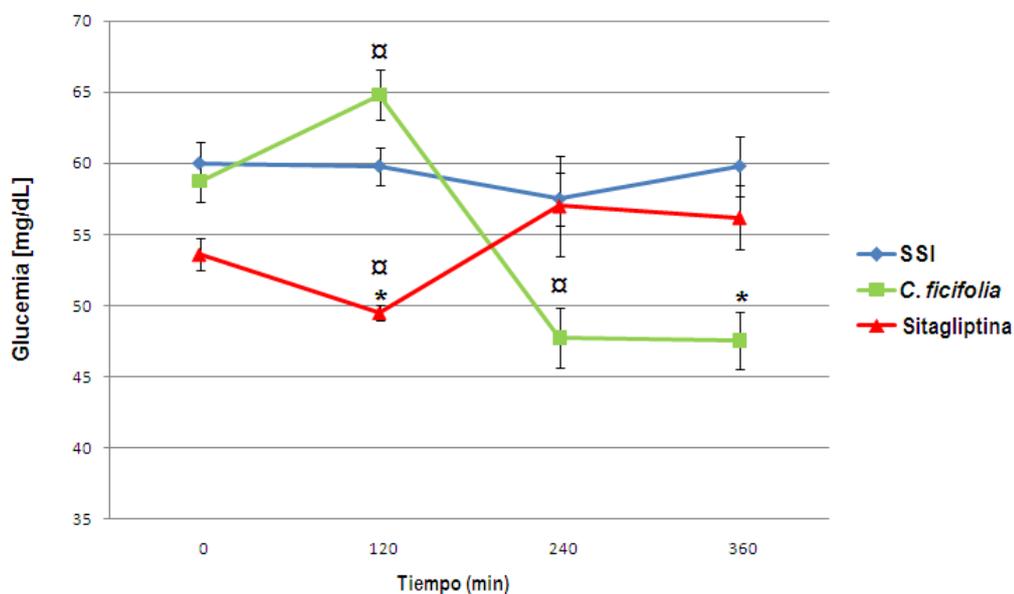


Figura 2. Glucemias después de la administración de *C. ficifolia*, SSI y sitagliptina. Media \pm S.E.M. (n=10). *Diferencia significativa respecto al grupo control (p<0.05). α Diferencia significativa con respecto al valor inicial (p<0.05).

A lo largo de la administración diaria se realizaron cuantificaciones de la glucosa en los diferentes grupos experimentales, así como en diferentes etapas del metabolismo. Los niveles de glucosa en estado de ayuno (12 h) después de 15 días de tratamiento con el extracto de *C. ficifolia* o con sitagliptina, no mostraron diferencias significativas con respecto a la glucemia inicial (T=0) (Figura 3).

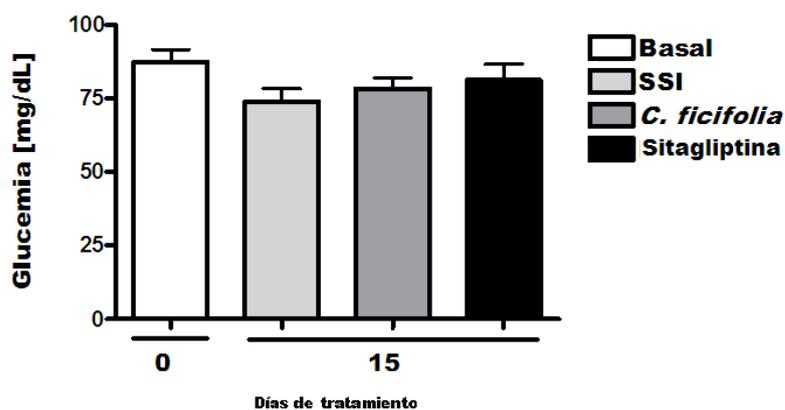


Figura 3. Glucemia inicial (T = 0) y a los 15 días del tratamiento con SSI (control), *C. ficifolia* y sitagliptina en ratones normoglucémicos con ayuno de 12 h (Media \pm S.E.M., n=10).

Como ya se mencionó, la glucemia se determinó al inicio (T=0) y a los 15 días de tratamiento en ratones normoglucémicos, mientras que en los ratones que recibieron STZ las determinaciones se hicieron los días 23 y al final del experimento (45 días). Como se observó, en los ratones normales no se detectaron cambios significativos en la glucemia después de 15 días de administración. Sin embargo, al día 23 después de la administración de STZ, se observó un incremento significativo en los niveles de glucosa respecto al control normoglucémico. También se observó disminución significativa en los niveles de glucosa al final del tratamiento, tanto con el extracto de *C. ficifolia* como con sitagliptina, comparado con ambos grupos control (normal y diabético sin tratamiento) (Figura 4).

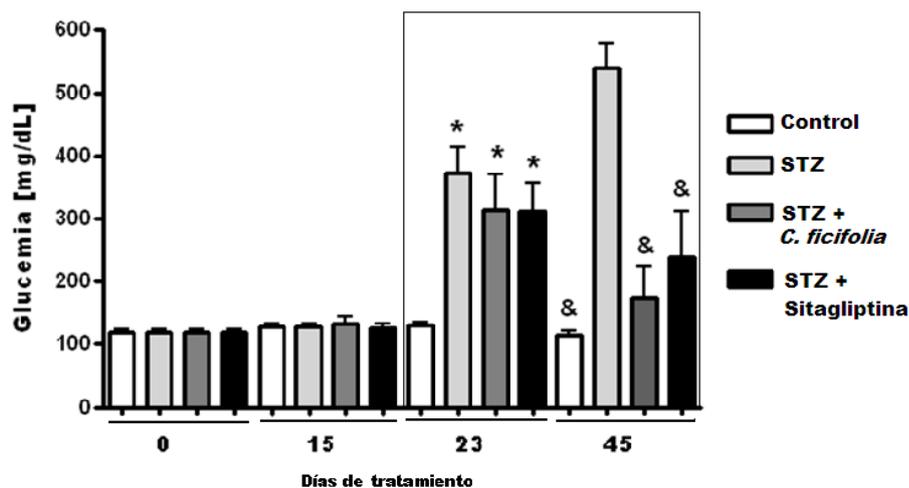
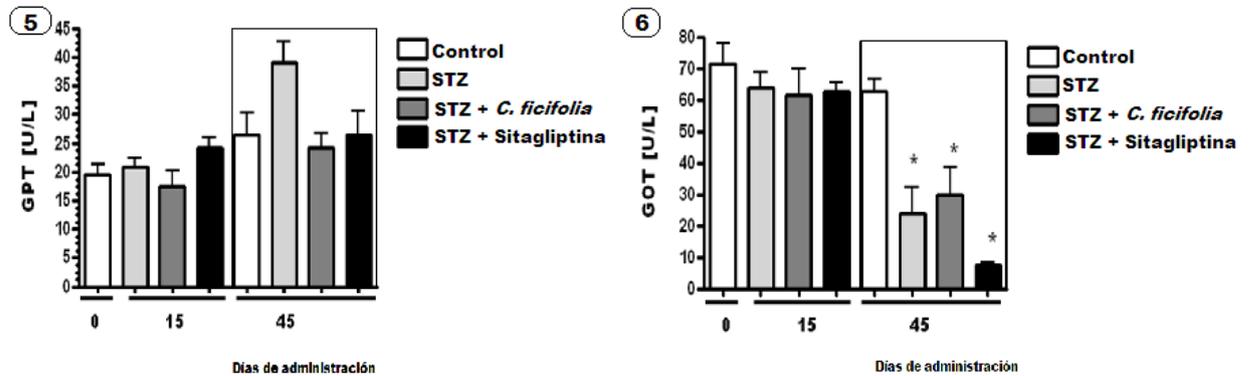


Figura 4. Glucemia con libre acceso a alimento en los ratones con los tratamientos Control (SSI), STZ + extracto acuoso de *C. ficifolia* y STZ + Sitagliptina al inicio (T=0), a los 15, 23 y 45 días de tratamiento. Media \pm S.E.M. (n=5). *Diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0.05$). & Diferencia significativa respecto a STZ ($p < 0.05$).

9.3 Efecto de la administración diaria de *C. ficifolia* sobre parámetros bioquímicos

Durante el estudio farmacológico se cuantificaron diversos parámetros bioquímicos, marcadores del metabolismo y de toxicidad. Los niveles de GPT en los

grupos tratados con *C. ficifolia* y sitagliptina tienden a disminuir en los animales diabéticos al final del tratamiento, mientras que los de GOT muestran una clara reducción en relación con el control diabético al final del tratamiento (Figuras 5 y 6).



Figuras 5 y 6. Niveles plasmáticos de 5) GPT y 6) GOT en los ratones con los tratamientos Control (SS), STZ + extracto acuoso de *C. ficifolia* y STZ + Sitagliptina, al inicio (T = 0), 15 y 45 días del tratamiento. Media \pm S.E.M. (n=5) *Diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Por otra parte, se cuantificaron los niveles de triglicéridos en sangre a lo largo del estudio farmacológico. Tanto el tratamiento con *C. ficifolia* como con sitagliptina mostraron una disminución significativa al final del estudio, es decir al día 45 de tratamiento (Figura 7).

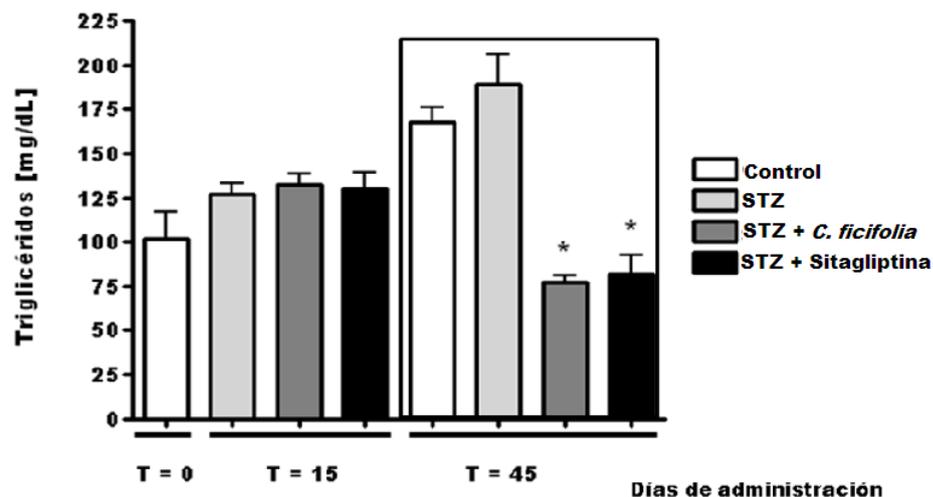


Figura 7. Niveles plasmáticos de triglicéridos en los ratones con los tratamientos Control (SS), STZ + extracto acuoso de *C. ficifolia* y STZ + Sitagliptina, basal (T=0), 15 y 45 días del tratamiento. Media \pm S.E.M. (n=5) *Diferencia significativa respecto al grupo STZ ($p < 0.05$).

Otro de los parámetros bioquímicos metabólicos que se evaluaron durante el estudio farmacológico fue el peso corporal, el cual mostró una disminución significativa en los grupos a los cuales se les indujo diabetes experimental el día 23. Sin embargo, el grupo tratado con sitagliptina registró un incremento, respecto al grupo STZ al final del tratamiento (Figura 8).

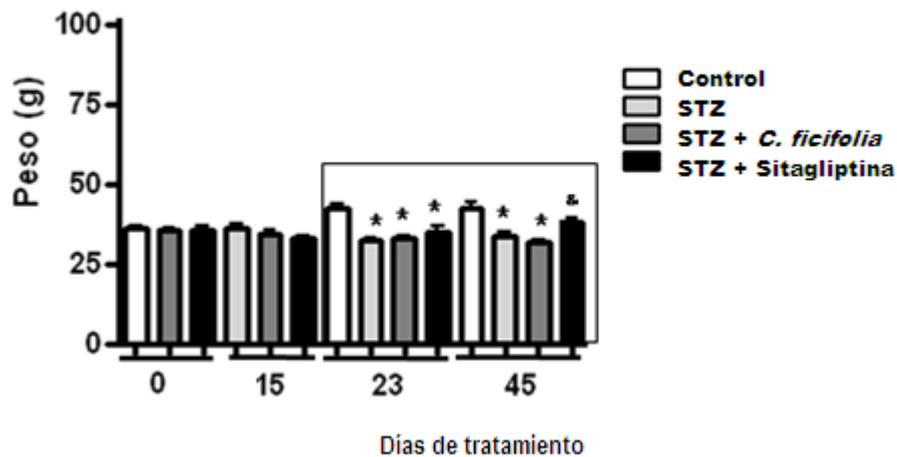


Figura 8. Peso corporal de los ratones con los tratamientos Control (SSI), STZ + extracto acuoso de *C. ficifolia* y STZ + Sitagliptina. Se muestra el peso al tiempo basal (T = 0), a los 15, 23 y 45 días del tratamiento. Media \pm S.E.M. (n=5). * Diferencia significativa respecto al Control ($p < 0.05$). & Diferencia significativa respecto al grupo STZ + *C. ficifolia* ($p < 0.05$).

9.4 Efecto de *C. ficifolia* sobre las concentraciones séricas de insulina.

Durante el estudio agudo con ratones normoglucémicos se cuantificaron los niveles séricos de insulina por la administración de *C. ficifolia* y sitagliptina. En la Figura 9 se muestra que, a pesar de que existe un incremento aparente en los niveles de esta hormona en el grupo tratado con sitagliptina, no existen cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales.

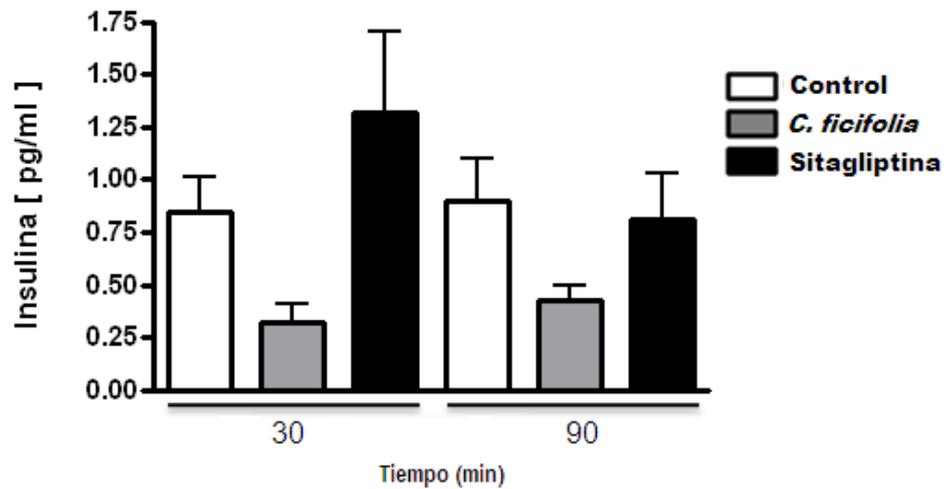


Figura 9. Concentraciones séricas de insulina en los ratones normoglucémicos con los tratamientos Control (SSI), extracto acuoso de *C. ficifolia* y sitagliptina al minuto 30 y 90. Media \pm S.E.M. (n=5).

Las concentraciones de insulina en los ratones tratados con STZ oscilan entre 0.1 y 0.6 pg/ml, mientras que en los animales normoglucémicos la concentración de esta hormona es de 0.25 a 1.30 pg/ml. En la Figura 10 se puede observar que las concentraciones de insulina en ratones tratados con *C. ficifolia* aumentan a partir del minuto 30 y continúa ascendiendo hasta el minuto 90 de manera significativa, a este tiempo, con respecto al control diabético.

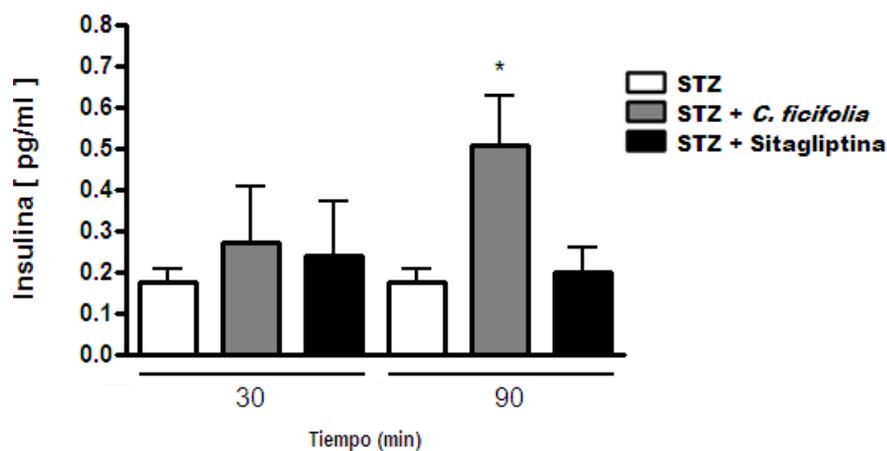


Figura 10. Concentraciones séricas de insulina en los ratones hiperglucémicos sometidos a un estudio agudo, y determinadas a los 30 y 90 minutos. Media \pm S.E.M. (n=5). * Diferencia significativa respecto al grupo control STZ ($p < 0.05$).

A lo largo del estudio crónico farmacológico, se cuantificaron los niveles séricos de insulina en los diferentes grupos experimentales. En la Figura 11 se puede observar que los niveles de esta hormona tienden a disminuir al día 45 de tratamiento en todos los grupos, tanto en el grupo normoglucémico control como en los grupos con diabetes experimental (STZ) tratados con *C. ficifolia* y sitagliptina. Cabe mencionar que el suero se obtuvo 12 horas después de la administración de los tratamientos.

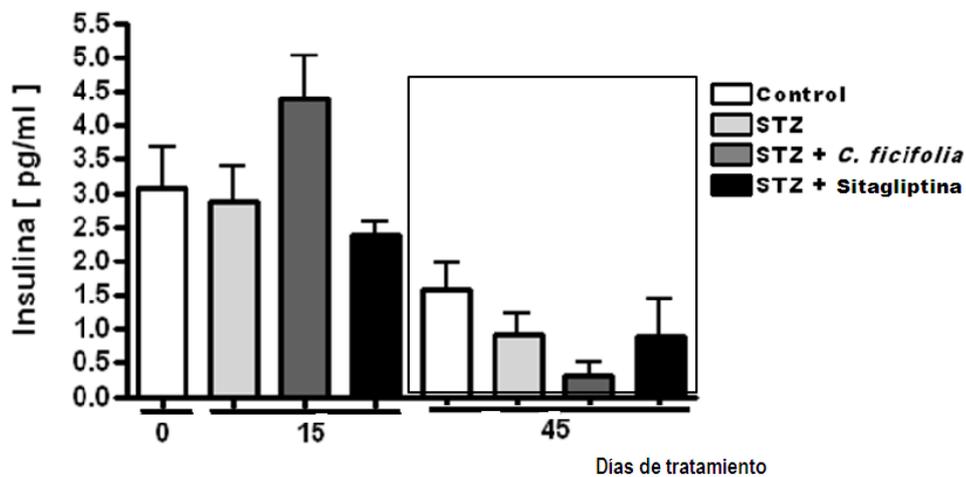


Figura 11. Concentraciones séricas de insulina de los ratones con los tratamientos Control (SSI), STZ + extracto acuoso de *C. ficifolia* y STZ + Sitagliptina, al inicio (T = 0), a los 15 y 45 días. Media \pm S.E.M. (n=5).

9.5 Efecto de *C. ficifolia* sobre la histología del hígado

Las fotomicrografías de la histología del hígado de los ratones con los diferentes tratamientos se pueden observar en la Figura 12. Se observan hepatocitos con núcleos eucromáticos y nucleólos (*). Se pueden identificar lobulillos hepáticos (recuadro), la vena central del lobulillo hepático (\rightarrow), los cordones de hepatocitos (\leftrightarrow) y algunas células de Kupffer (Δ) localizadas en el espacio sinusoidal; así como algunas células endoteliales que revisten a la vena central (\blacktriangleright). Los grupos tratados con solución salina isotónica (Fig. 12B) y con *C. ficifolia* (Fig. 12C) a los 15 días de

tratamiento, no mostraron cambios aparentes en la histología del hígado, conservando la estructura general del lóbulo hepático, mientras que el grupo que recibió sitagliptina (Fig 12D), muestra una alteración del lóbulo hepático, congestión vascular, un estado de hiperemia (Hi), degeneración hidrópica (*) e infiltrado leucocitario (IL), principalmente de neutrófilos, característico de un estado inflamatorio.

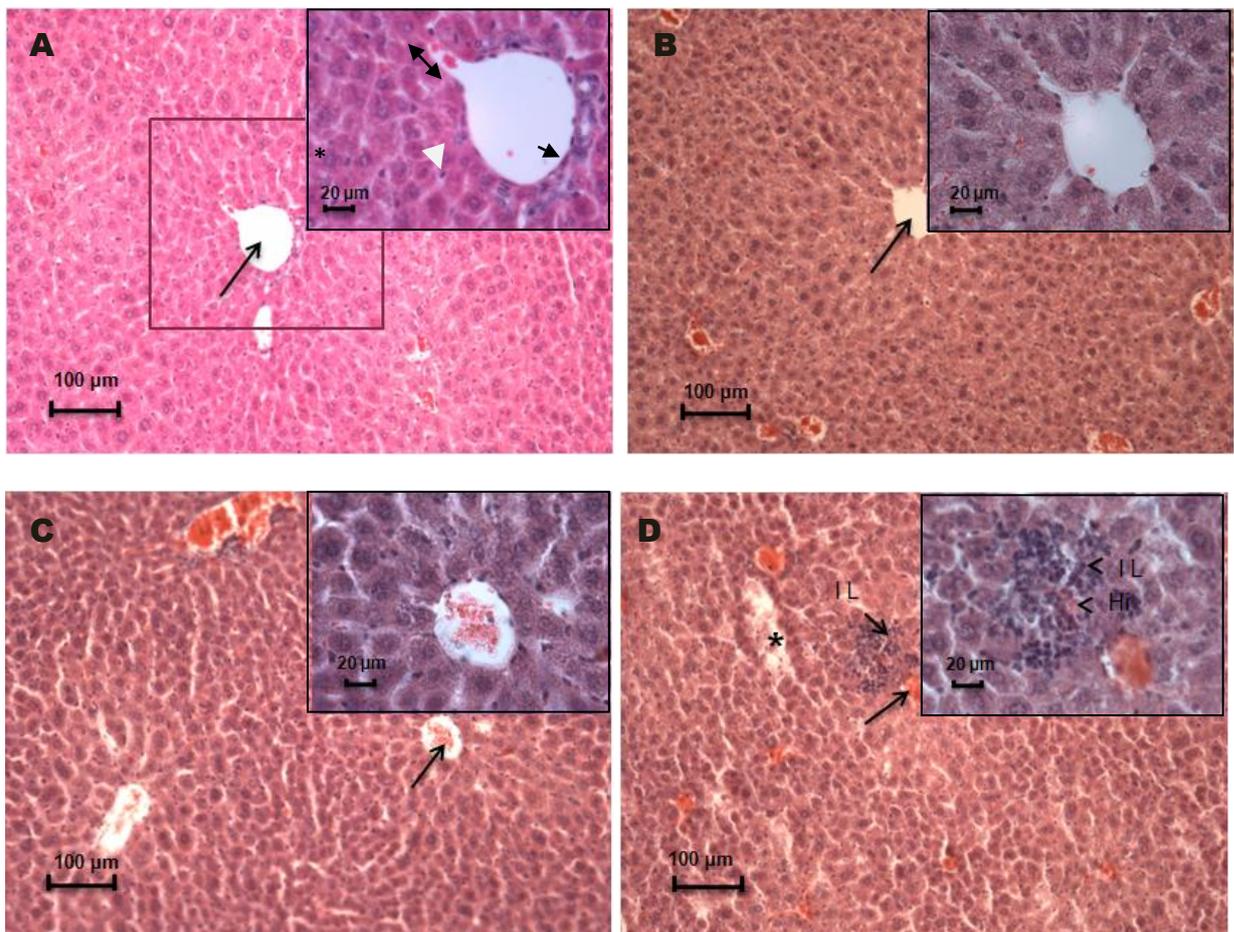
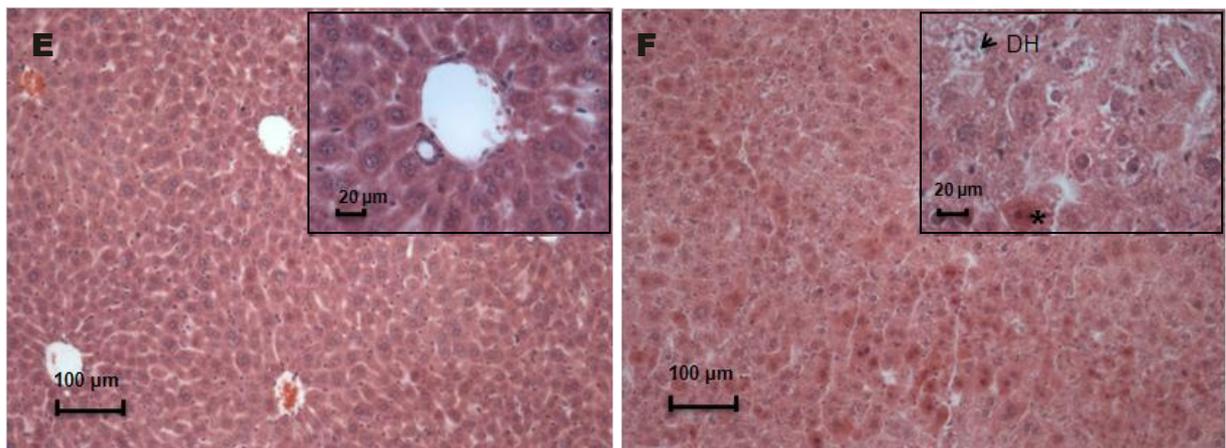


Figura 12. Fotomicrografías de cortes longitudinales de hígado de ratón normoglucémicos por la administración diaria de los tratamientos, teñidos con H-E, aumento original principal x100 y recuadro x400. **A.** Sano; **B.** Normoglucémico tratado con SSI durante 15 días; **C.** Normoglucémico tratado con *C. ficifolia* durante 15 días; **D.** Normoglucémico tratado con sitagliptina durante 15 días.

Respecto a la histología del hígado de los ratones hiperglucémicos con STZ observamos que, mientras el grupo sano tratado con SSI durante 45 días (Fig. 13E) conserva la estructura general de los lóbulos hepáticos, el grupo hiperglucémico (STZ) tratado con SSI (Fig. 13F) muestra desarreglo de los lóbulos hepáticos y daño celular como degeneración hidrópica (DH); a mayor aumento se corroboraron los indicios de este daño celular por la presencia de vesiculización típica de la degeneración hidrópica; además observamos cariólisis y cariorresis, así como alteración de las regiones citoplasmáticas y un aumento de acidofilia citoplasmática (*). Mientras que el grupo hiperglucémico tratado con *C. ficifolia* durante 45 días (Fig. 13G) mantiene su estructura general hepática; sin embargo, se observaron algunas células con daño, pero en menor proporción que el grupo hiperglucémico (STZ) tratado con SSI. En el grupo hiperglucémico tratado con sitagliptina (figura 13H) por 45 días se volvió a observar infiltrado leucocitario (IL) y células con indicios de daño en menor proporción que en el grupo hiperglucémico tratado con SSI.



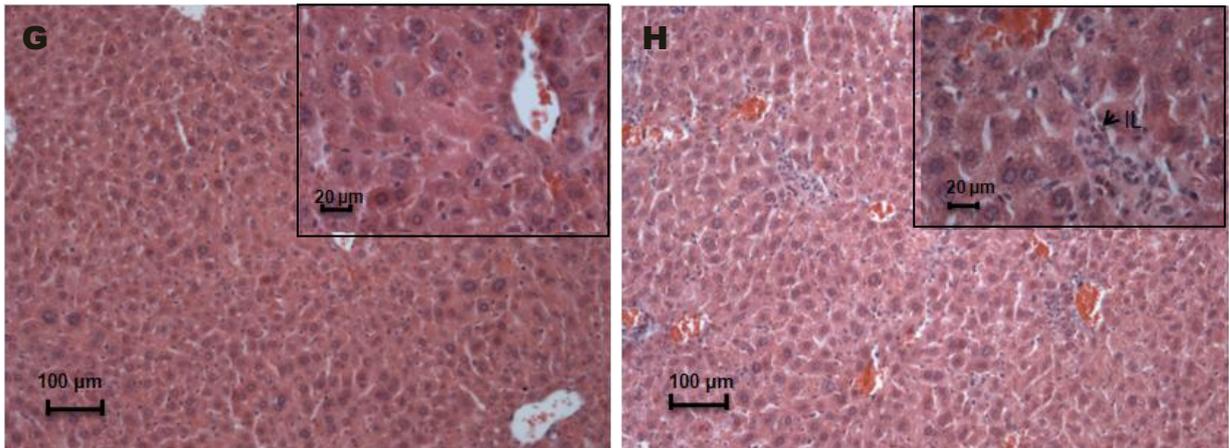


Figura 13. Fotomicrografías de cortes longitudinales de hígado de ratón, teñido con H-E, aumento original principal x100 y recuadro x400. **E.** SSI durante 45 días; **F.** SSI + STZ durante 45 días; **G.** *C. ficifolia* + STZ durante 45 días; **H.** Sitagliptina + STZ durante 45 días.

Respecto a la secciones de hígado de ratones con diabetes inducida experimentalmente y normoglucémicos, teñidos con la técnica de PAS observamos la distribución y acumulación de hidratos de carbono, principalmente glucógeno, en color rosa. En el grupo normoglucémico tratado con SSI por 45 días se observó la acumulación de glucógeno, principalmente alrededor de la vena central del lóbulo hepático (Fig. 14I), mientras que el grupo al cual se le indujo diabetes experimental (STZ) tratado con SSI por 45 días, la distribución es heterogénea en el parénquima, tanto en hepatocitos como en los espacios sinusoidales (Fig. 14J); Por su parte, en el grupo tratado con *C. ficifolia* la acumulación de glucógeno es amplia, no localizada, pero si distribuida en todo el parénquima hepático (Fig. 14K). En el grupo hiperglucémico tratado con sitagliptina por 45 días, la acumulación de glucógeno es aún mayor comparada con el grupo normoglucémico tratado con SSI (Fig. 14L).

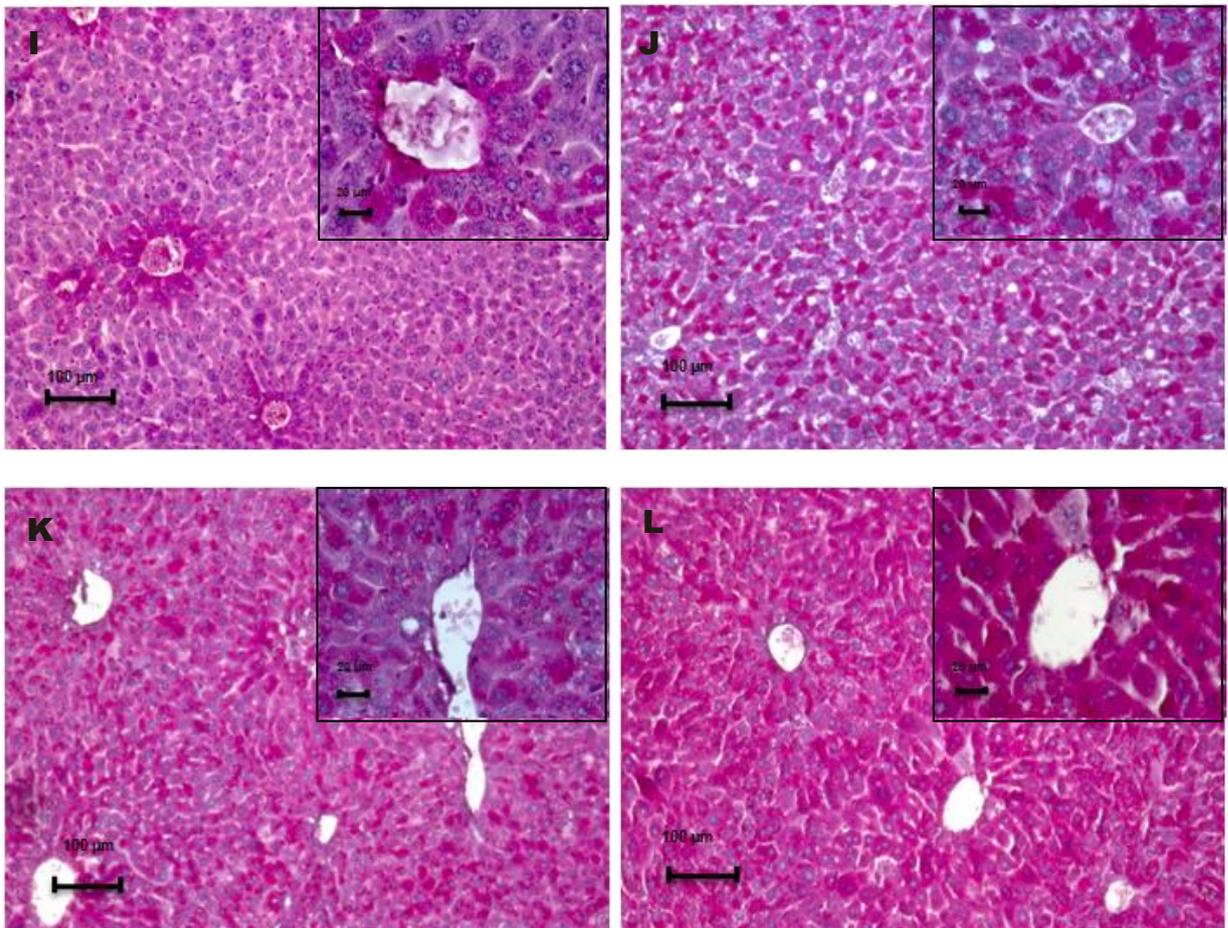


Figura 14. Fotomicrografías de cortes longitudinales de hígado de ratón, teñido con PAS, aumento original principal x100 y recuadro x400. **I.** SSI durante 45 días; **J.** SSI + STZ durante 45 días; **K.** *C. ficifolia* + STZ durante 45 días; **L.** Sitagliptina + STZ durante 45 días.

9.6 Efecto de *C. ficifolia* sobre la histología de riñón

Respecto a la histología del riñón, en la Figura 15 se observa un corte longitudinal de los ratones normoglucémicos al día 15 de tratamiento. Se analizó la zona cortical, donde se pueden observar los túbulos contorneados (\leftrightarrow), algunos glomérulos (*), siendo éstos las unidades filtradoras de sangre en este órgano, y en su interior se localiza el tejido mesangial (m) constituido por tejido conectivo. En las siguientes fotomicrografías de riñón se determinó que no hubo cambios en la histología de este órgano por la administración diaria y al día 15 de tratamiento.

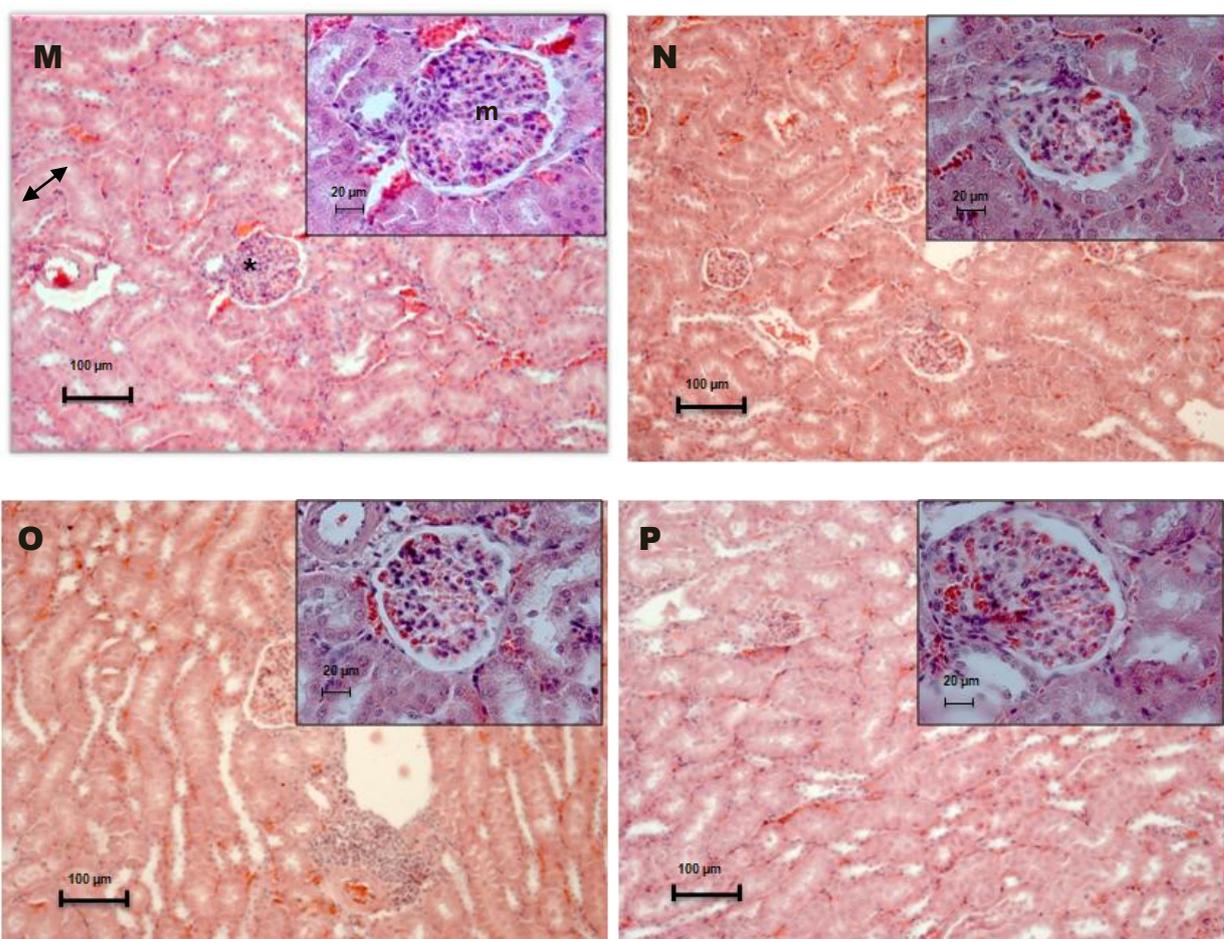


Figura 15. Fotomicrografías de cortes longitudinales de riñón de ratón, teñido con H-E, aumento original principal x100 y recuadro x400. **M.** Sano sin tratamiento; **N.** Normoglucémico tratado con SSI durante 15 días; **O.** Normoglucémico tratado con *C. ficifolia* 15 días; **P.** Normoglucémico tratado con sitagliptina 15 días.

En las siguientes fotomicrografías (Fig. 16) de cortes longitudinales de riñón de ratones con diabetes inducida con STZ se observó, en la zona cortical, congestión vascular (señalada con la flecha) en los glomérulos, tanto en el grupo diabético tratado con *C. ficifolia* como en el grupo diabético tratado con sitagliptina. A este tiempo de tratamiento no se observan cambios característicos en los glomérulos, en su membrana, ni en la matriz mesangial, como los son: los nódulos de Kimmelstiel-Wilson, engrosamiento de la matriz mesangial y capuchones de fibrina que

generalmente se observan durante la evolución de la DM por el estado hiperglucémico característico de esta patología (Stevens *et al.*, 2003).

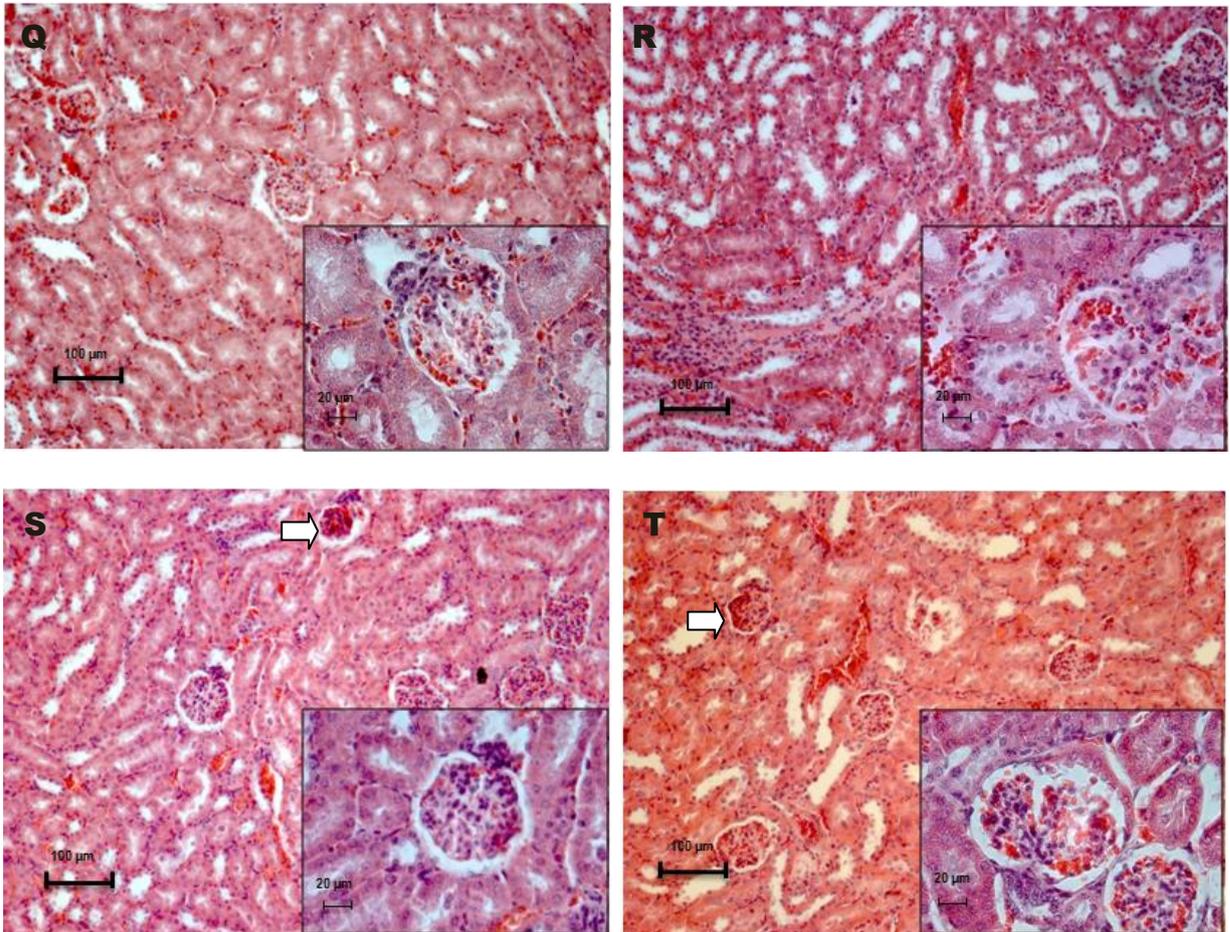


Figura 16. Fotomicrografías de cortes longitudinales de riñón de ratón, teñido con H-E, aumento original principal x100 y recuadro x400. **Q.** SSI durante 45 días; **R.** SSI + STZ durante 45 días; **S.** *C. ficifolia* + STZ durante 45 días; **T.** Sitagliptina + STZ durante 45 días.

9.7 Efecto de *C. ficifolia* sobre el páncreas.

En las siguientes fotomicrografías de cortes longitudinales podemos identificar la estructura general de este órgano: la zona exocrina constituida por acinos pancreáticos de tipo epitelial (flecha), la zona endocrina o islotes pancreáticos (*) constituidos por diversos tipos celulares como: células alfa, beta, delta y las productoras del polipéptido pancreático (Fig. 17U). En las fotomicrografías de este

órgano se observó la presencia de infiltrado leucocitario (IL) y un estado de hiperemia (Hi) en el grupo control diabético y con el tratamiento de sitagliptina, mientras que con el tratamiento con *C. ficifolia* sólo se observó un estado de hiperemia.

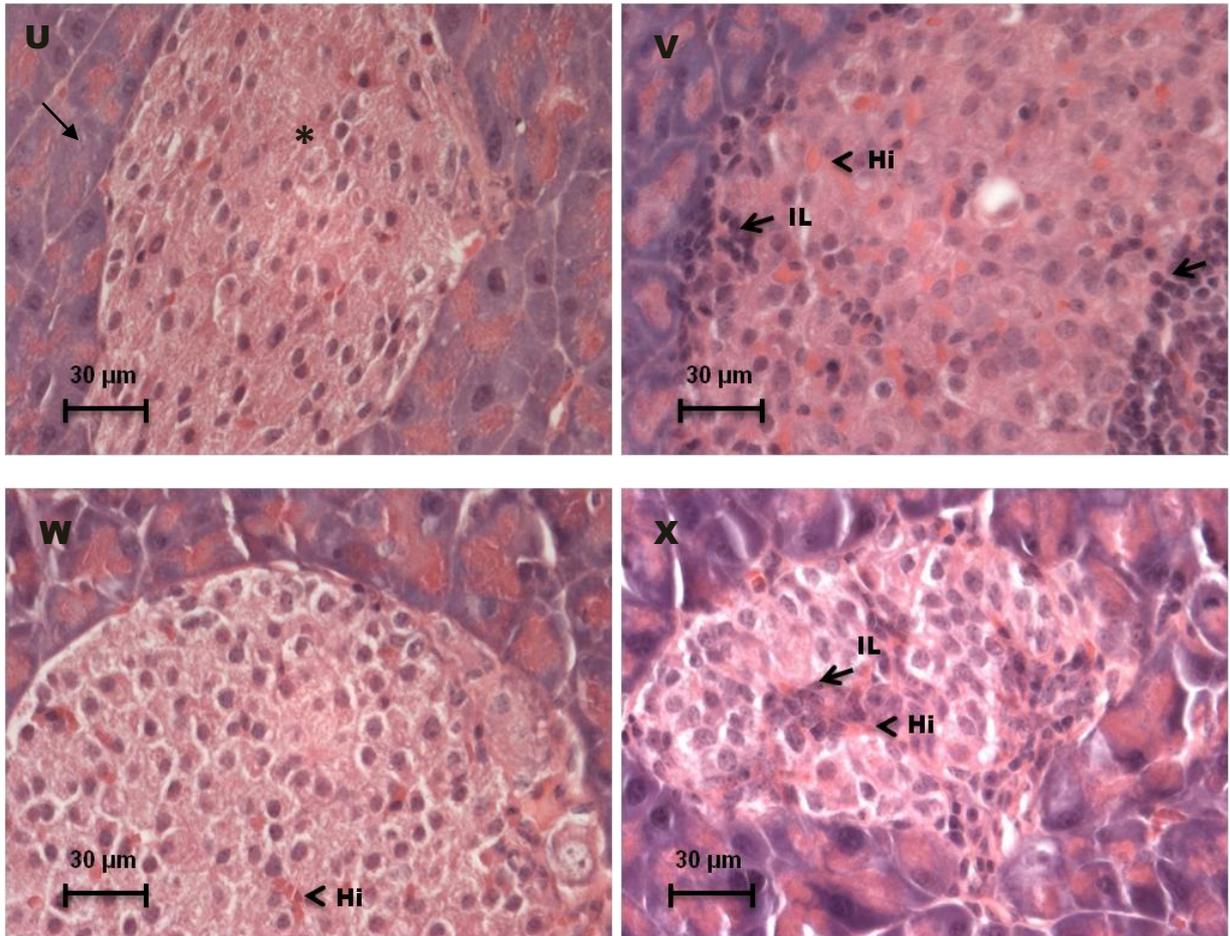


Figura 17. Fotomicrografías de cortes longitudinales de páncreas de ratón, teñido con H-E, aumento original x400. **U.** SSI durante 45 días; **V.** SSI + STZ durante 45 días; **W.** *C. ficifolia* + STZ durante 45 días; **X.** Sitagliptina + STZ durante 45 días.

En cuanto al análisis estereológico, donde se analizaron diferentes campos a diferentes densidades de corte, se midió el área total de los islotes pancreáticos y en la siguiente gráfica se muestra que hubo una disminución en el área de los islotes en los grupos diabéticos tratados con *C. ficifolia* y sitagliptina con respecto al control.

Cabe señalar que el área de los islotes pancreáticos en el grupo normoglucémico control es aproximadamente tres veces superior al área de los grupos con diabetes experimental.

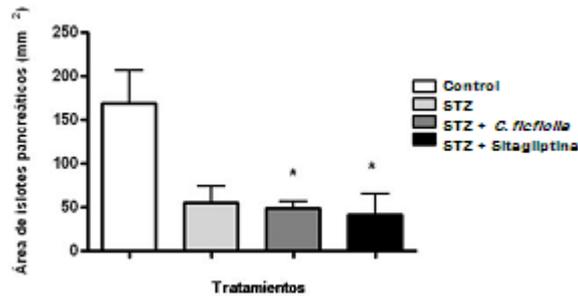


Figura 18. Área de los islotes páncreáticos de los ratones con los tratamientos. Control (SSI), STZ (SSI), STZ + extracto acuoso de *C. ficifolia* y STZ + Sitagliptina, a los 45 días del tratamiento. Media \pm S.E.M. (n=5). *Diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0.05$).

En cuanto al número de islotes pancreáticos podemos observar en la Figura 19 que el grupo diabético tratado con *C. ficifolia* tiende a mantener el número de islotes pancreáticos respecto al control, sin diferencia significativa, mientras que el grupo diabético tratado con solución salina y sitagliptina disminuyen el número de islotes pancreáticos significativamente respecto al control.

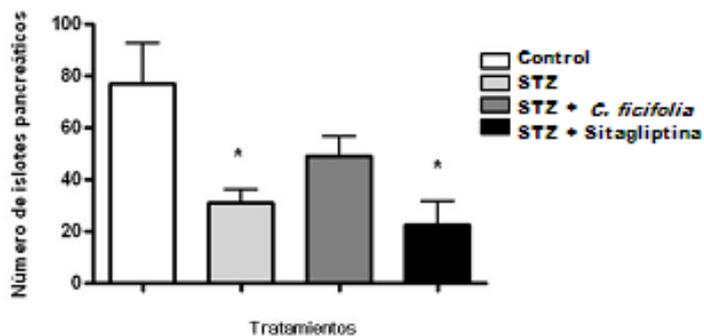
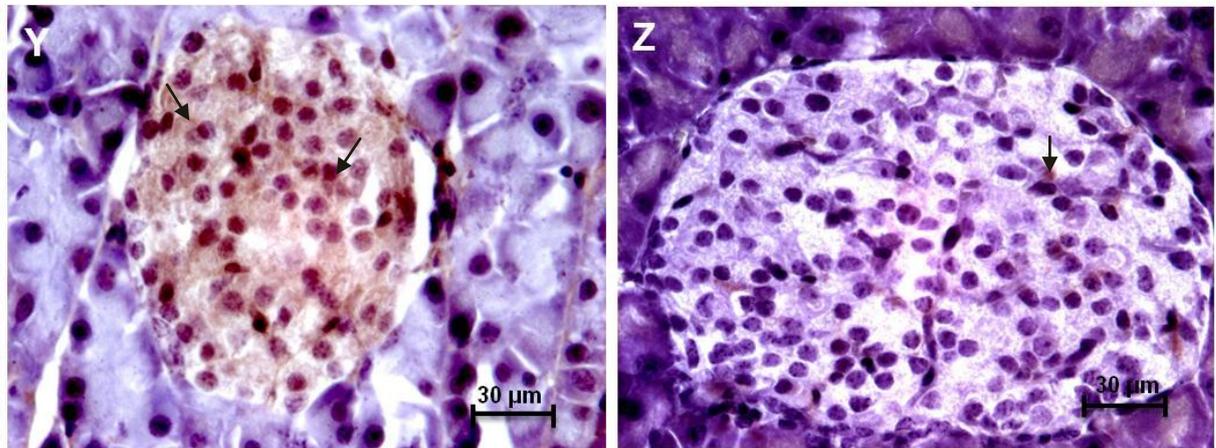


Figura 19. Número de islotes páncreáticos de los ratones con los tratamientos. Control (SSI), STZ (SSI), STZ + extracto acuoso de *C. ficifolia* y STZ + Sitagliptina, a los 45 días del tratamiento. Media \pm S.E.M. (n=5). *Diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0.05$).

En cuanto al análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo polyclonal CDK4 (detección colorimétrica con DAB) y cuya dilución fue 1:40, en las siguientes fotomicrografías de páncreas se observa la inmunodetección de CDK4, tanto nuclear y citoplasmática (color café) en los islotes pancreáticos del grupo control normoglucémico (Fig. 20); en el grupo diabético control, la inmunodetección es menor comparada con el control; mientras que el grupo diabético tratado con *C. ficifolia* la inmunodetección es más intensa en los islotes pancreáticos comparada con el control y, en el grupo diabético tratado con sitagliptina, también se observa la inmunodetección de CDK4. Estos resultados sugieren que la proteína CDK4 se sintetiza en condiciones normoglucémicas y que el tratamiento con *C. ficifolia* aumenta la cantidad de ésta proteína, cualitativamente por inmunodetección en ratones diabéticos.



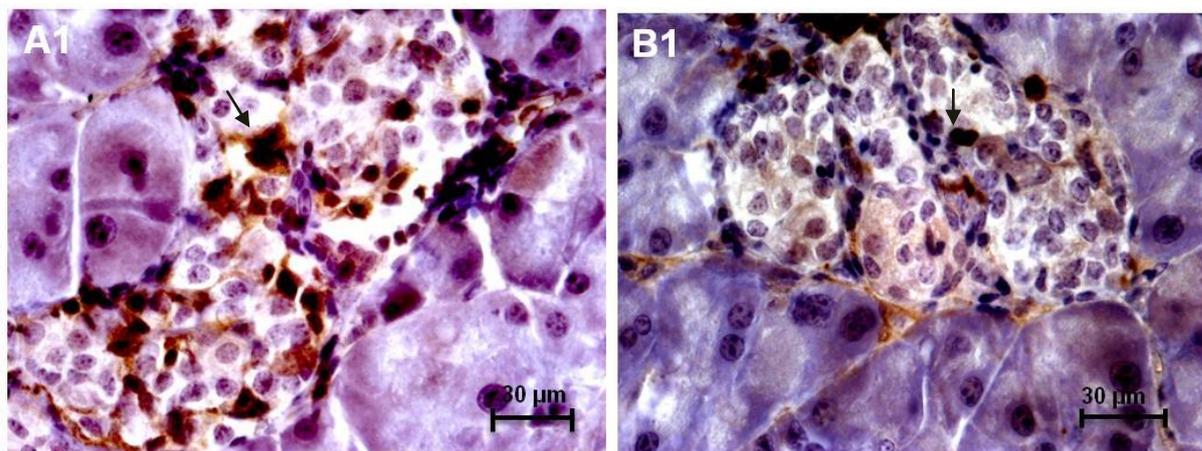


Figura 20. Fotomicrografías del análisis inmunohistoquímico de CDK4 en cortes longitudinales de páncreas de ratón, aumento original x400. **Y.** SSI durante 45 días; **Z.** SSI + STZ durante 45 días; **A1.** *C. ficifolia* + STZ durante 45 días; **B1.** Sitagliptina + STZ durante 45 días.

10. DISCUSIÓN

La inducción de diabetes experimental con STZ en los ratones de dos meses de edad provoca un incremento en los niveles de glucosa, alteraciones en el perfil lipídico y disminución del peso corporal, lo que los hace un modelo experimental apropiado para el estudio de esta patología.

En esta investigación, la administración intragástrica de *C. ficifolia* reduce los niveles de glucosa en los ratones sanos (normoglucémicos) y en los diabéticos, tal como se había reportado en estudios previos (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002). Esto indica que el extracto tiene un efecto importante sobre el metabolismo de la glucosa y dicho efecto podría deberse al D-qui-ro-inositol, compuesto al cual se le ha atribuido el efecto hipoglucémico (Xia y Wang, 2007)

C. ficifolia disminuye el peso corporal en ratones diabéticos, efecto que podría verse reflejado por la inhibición de PPAR- γ , factor de transcripción que regula la adipogénesis (Schiffrin, 2003), así como la disminución en la expresión de este factor

de transcripción, y un aumento en la expresión de PPAR- α , el cual está implicado en la oxidación de ácidos grasos en hígado. Ambos eventos pueden reflejarse en la reducción de los niveles de triglicéridos a nivel plasmático (Ramírez-Luna, 2010), resultando en una reducción del peso corporal, característico de DT2. Cabe señalar que en esta patología hay un aumento en el catabolismo de lípidos para contrarrestar el metabolismo energético debido a una disminución en la incorporación de glucosa (ADA, 2011); sin embargo, el extracto contiene carbohidratos y se ha reportado que algunos oligosacáridos pueden disminuir la adipogénesis al inhibir la expresión de C/EBP y PPAR- γ (Cho *et al.*, 2008), por lo que no se descarta que dichos compuestos pudieran participar en la alteración del perfil lipídico y, por tanto, en el peso corporal. La sitagliptina tiende a aumentar el peso corporal al final de tratamiento, lo cual sugiere que tiende a contrarrestar la pérdida de peso ocasionada por la diabetes experimental. Se tienen reportes en el que la incretina GIP inhibe la lipólisis, aumenta la actividad de lipoproteína lipasa y la acumulación de triglicéridos a través de una vía que involucra un incremento en la fosforilación de PKB, que induce un aumento en el almacenamiento de grasa y diferenciación en adipocitos (Kim y Egan, 2008).

Por otro lado, se observó una reducción significativa en los niveles de GOT en el grupo tratado con *C. ficifolia*, siendo esta transaminasa un marcador a largo plazo de daño hepático (síndrome biológico de citólisis), que se expresa con un aumento de la permeabilidad de membrana celular hasta necrosis (Cuadrado y Crespo, 2004). Dicho evento se correlaciona con el análisis histológico en hígado, con la tinción H-E, en el cual se pudo observar que el tratamiento con el extracto mantuvo la estructura general de este órgano sin cambios morfológicos, comparado con el grupo diabético que mostró indicios de daño por la presencia de degeneración hidrópica, acidofilia

citoplasmática y muerte celular por la presencia de cariólisis y cariorresis, además de que en este grupo se observaron niveles elevados de GPT, indicando daño hepático, sin diferencia significativa.

Por otro lado, los niveles séricos de insulina en el estudio agudo de ratones normoglucémicos no parecen modificarse; sin embargo, en el grupo hiperglucémico aumentan los niveles de esta hormona significativamente, mientras que en el estudio subcrónico las concentraciones de dicha hormona no se ven alteradas con los diferentes tratamientos. Cabe señalar que la obtención de las muestras de sangre se realizaron doce horas posteriores después de la administración de los tratamientos, por lo que no pudo verse reflejado el incremento de dicha hormona, sobretodo si tomamos en cuenta la vida media de esta hormona (que va de 3 a 6 minutos), además de que la secreción de esta hormona puede darse dos horas después de la ingestión de alimentos (Hellman *et al.*, 2007).

En este trabajo queda demostrado que *C. ficifolia* tiene efecto sobre la secreción de insulina, tal como previamente se determinó en un estudio con la administración diaria de *C ficifolia* en ratas y D-quiró-inositol. A este compuesto se le ha implicado también en la regulación de la señalización de insulina, teniendo también un efecto directo sobre la secreción de dicha hormona (Xia y Wang, 2007).

En cuanto a la tinción de PAS en hígado, el grupo diabético control muestra una distribución heterogénea y no localizada de este carbohidrato, lo que podría estar relacionado con la deficiencia de insulina en el modelo diabético. Un efecto de esta hormona es la inhibición de la producción de glucosa por la vía de la gluconeogénesis y al estar reducida la hormona hay un incremento en la producción de glucosa, por lo que el glucógeno tiende a acumularse en el interior de los hepatocitos (Ganong,

1998). Por otro lado, con el tratamiento con *C. ficifolia* la acumulación y distribución de glucógeno en el parénquima hepático es aún mayor. Dicho evento se correlaciona con estudios anteriores en los que se cuantificó el contenido de glucógeno en los hepatocitos de rata con un tratamiento, tanto con *C. ficifolia* como con D-quirositol (Xia y Wang, 2006). Mientras que con sitagliptina la acumulación de glucógeno es homogénea y mayor que con *C. ficifolia*, evento que se relaciona con estudios anteriores donde se demostró un aumento en la actividad de la glucógeno sintasa (enzima implicada en la síntesis de glucógeno) en hepatocitos extraídos de ratas normales y diabéticas (Kim y Egan, 2008), fosfoenolpiruvato carboxilasa, y glucosa-6-fosfatasa en ratones obesos diabéticos. Además, con el tratamiento de dicha sitagliptina se reducen significativamente los niveles de glucosa, ya que su mecanismo de acción es aumentar la señalización de insulina y mejorar su sensibilidad (Lee *et al.*, 2007); sin embargo, en este estudio no se modificaron los niveles séricos de esta hormona, lo cual puede deberse a que la obtención de sangre de los ratones se realizó doce horas posteriores a la administración de los tratamientos, en una etapa durante el día en donde aún se encuentra disminuida su actividad física y, por tanto, el consumo de alimento. (Kim y Egan, 2008).

En cuanto a la histología de riñón, *C. ficifolia* no mostró cambios aparentes en la estructura general de la zona cortical, principalmente en los glomérulos, la unidad filtradora hacia los túbulos renales (filtración glomerular) y a los capilares. La administración diaria del extracto tiende a mantener la estructura general de este órgano a este tiempo de tratamiento; es claro que tampoco se encontraron modificaciones en los glomérulos característicos de diabetes, ni en las células mesangiales que constituyen esta unidad, ya que estas células al contraerse invaden

los capilares y por tanto una disminución de la filtración glomerular por un estado hiperglucémico característico de diabetes (Cabezas *et al.*, 2004).

C. ficifolia mostró cambios importantes en el patrón de distribución de células positivas a CDK4 en los islotes pancreáticos en comparación con los ratones normales y diabéticos, sin embargo, también, se observaron células sin inmunodetección del anticuerpo. Este hecho podría ser atribuido al daño parcial generado por STZ, sugiriendo que estas células pueden tener capacidad de recuperación ante la agresión con STZ ya que con el tratamiento de *C. ficifolia* no se observó infiltrado leucocitario en los islotes pancreáticos comparado con el control diabético y sitagliptina. Así, *C. ficifolia* podría desempeñar un papel importante aumentando la cantidad de CDK4, la secreción de insulina y una tendencia a incrementar el número de islotes pancreáticos; en estudios previos reportados se observó un incremento en las concentraciones de insulina e hiperplasia de células β pancreáticas por la sobreexpresión de CDK4 en ratones transgénicos (Hino *et al.*, 2004). Además se confirmó que CDK4 se encuentra implicada en la funcionalidad de las células β por un aumento en la insulina y se determinó que la vía CDK4- pRB-E2F1 se encuentra regulando la función de células β , regulando la secreción de insulina dependiente de glucosa a través de la expresión de Kir6.2 (Jean-Sébastien *et al.*, 2009).

Nuestros resultados sugieren que el extracto de *C. ficifolia* tiene un efecto benéfico en ratones diabéticos a través de su acción hipoglucemiante y regeneradora celular, ayudando a mantener un buen control glucémico y metabólico, y probablemente disminuyendo las complicaciones vasculares características de DM, apoyando la idea de proponer a *C. ficifolia* como tratamiento complementario en DM.

Sin embargo es necesario continuar con más estudios para identificar los componentes que están llevando a cabo estos efectos, así como para dilucidar los mecanismos de acción implicados en ellos.

11. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* Bouché tiene efecto hipoglucémico, el cual puede ser asociado a una modificación en la distribución de glucógeno hepático.

2. El tratamiento con *Cucurbita ficifolia* Bouché tiene efecto sobre la proliferación de la célula β pancreática ya que produce un incremento de CDK4 e insulina sin alterar la estructura general del páncreas.

3. El tratamiento con *Cucurbita ficifolia* Bouché aminora el daño en hígado y riñón, así como la hipertrigliceridemia característica de DM.

4. El extracto de *Cucurbita ficifolia* Bouché representa una alternativa importante para el control de la diabetes, ya que además de tener efecto hipoglucémico influye sobre la proliferación de las células β pancreáticas.

12. REFERENCIAS

- ❖ Acosta JL, Jiménez E, Juárez MA, Díaz JC, 2001, Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels, *J Ethnopharmacol*, 77: 99-101.
- ❖ Ahlgren U y Jonsson J, 2001, Beta-cell-specific inactivation of the mouse Ipf-1/Pdx 1 gene results in loss of the beta cell phenotype and maturity onset diabetes, *Genes Dev*, 12: 1763-8.
- ❖ Alarcón-Aguilar FJ, Hernández E, Campos AE, Xolalpa S, Rivas JF, Vazquez LI, Román Ramos R, 2002, Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models, *J Ethnopharmacol*, 82: 185-189.
- ❖ Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, 2007, International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention, *Diabet Med*, 24: 451-463.
- ❖ American Diabetes Association, 2011, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care Supplement*, 1, 62-69.
- ❖ Andrade-Cetto A, Heinrich M, 2005, Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes, *J Ethnopharmacol*, 99: 325-348.
- ❖ Arana CJ y Domingo MF, 2001, Fisiopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético, *Gac Méd Méx*, 139: 265-264.
- ❖ Arechavaleta Granel Rosario, 2006, El efecto fisiológico de las hormonas incretinas, *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine*, 6: S581-S585.
- ❖ Aschner Pablo, García de los Ríos M, 2009, Guías ALAD de Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo2, *Asociacion Latinoamericana de Diabetes*, ISSN 0327-9154, 1-77.

- ❖ Azevedo-Meleiro CH, Rodriguez-Amaya DB, 2007, Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*, *J Agric Food Chem*, 55: 4027-4033.
- ❖ Banderas-Dorantes Tania R, 2011, “Mecanismo de acción hipoglucemiante, actividad antioxidante y antiinflamatorio de 3 plantas usadas en el control de la diabetes mellitus”, Tesis de doctorado UAM-I.
- ❖ Cabezas Cerrato J, Cabezas Agrícola JM, Touriño Pelalbab, 2004, Complicaciones Crónicas de la Diabetes Mellitus, *Medicine*, 990-999.
- ❖ Castro-Rodríguez M, y Rodríguez-Mañas L, 2006, El endotelio: una encrucijada en las complicaciones vasculares de la diabetes en el anciano, *Angiología*, 58:1-9.
- ❖ Chang CI, Chen CR, Liao YW, Cheng HL, Chen YC, Chou CH, 2008, Cucurbitane-type triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*, *J Nat Prod*, 71: 1327-1330.
- ❖ Chen JC, Chiu MH, Nie RL, Cordell GA, Qiu SX, 2005, Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities, *Nat Prod Rep*, 22: 386-399.
- ❖ Cho EJ, Rahman MA, Kim SW, Baek YM, Hwang HJ, Oh JY, Hwang HS, Lee SH, Yun JW, 2008, Chitosan oligosaccharides inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes, *J Microbiol Biotechnol*, 18: 80-87.
- ❖ Córdoba Villalobos JA, Hernández Ávila M, Ortiz Domínguez ME, De León-May ME, Sotelo Morales J, Fernández del Castillo B, Olmos Tomasini C, Kuri Morales P, 2008, Programa de acción específico 2007-2011 Diabetes Mellitus, *Secretaria de Salud*, pg 11.
- ❖ Cuadrado A y Crespo J, 2004, Hypertransaminasemia in patients with negative viral markers, *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 96: 484-500.

- ❖ Fajas Lluís, Blanchet Emilie, Annicotte Jean-Sébastien, 2010, CDK4, pRB and E2F1: connected to insulin, *Cell Division*, 5: 1-6.
- ❖ Ganong F, 1998, Fisiología Médica, 18 Edición, 373-397.
- ❖ García-González J, 2009, "Daños histopatológicos en varios órganos de ratón, por el efecto de plantas antidiabéticas", Servicio Social UAM-I, Clave: BE-021.07.
- ❖ Hanahan D, 1985, Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin / simian virus 40 oncogenes, *Nature*, 315 (6015): 115-22.
- ❖ Hancock RD, Chudek JA, Walker PG, Pont SD, Viola R, 2008, Ascorbic acid conjugates isolated from the phloem of Cucurbitaceae, *Phytochemistry*, 69: 1850-1858.
- ❖ Hellman B, Gylfe E, Grapengiesser E, Dansk H, Salehi A, 2007, Insulin oscillations-clinically important rhythm. Antidiabetic should increase the pulsative component of the insulin release, *Lakartidningen*, 104 (32-33): 2236-9.
- ❖ Hernández E, Campos AE, Alarcon-Aguilar FJ, Vazquez L, Flores JL, Roman R, 2002, Acute toxicological study of *Cucurbita ficifolia* juice in mice, *Proc West Pharmacol Soc*, 45: 42-43.
- ❖ Hino S, Yamaoka T, Yamachita Y, Hata J, Itakura M, 2004, In vivo proliferation of differentiated pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase, *Diabetología*, 47: 1819-1830.
- ❖ Jean-Sébastien A, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S, Teyssier J, Dalle S, Sardet C, y Fajas L, 2009, The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion, *Nature Cell Biology*, 11: 1017-1034.

- ❖ Jeong-Taek Woo, Kyung Soo Park, Dong-Won Byun, Kyung Soo Ko, Yoon-Sok Chung, Doo Man Kim, Tae Sun Park, Bong Soo Cha, In Kyu Lee, Joong Yeol Park, Hyun Shik Son, Moon-Kyu Lee, Kwang Won Kim, Ho Young Son, 2010, Regulation of Glucose Control in People with Type 2 Diabetes: A Review and Consensus, *Korean Diabetes J*, 34: 16-20.
- ❖ Ji-Hyeon Lee, Junghyo Jo, Anandwardhan A. Hardikar, Vipul Periwal, y Sushi G. Rane, 2010, Cdk4 Regulates Recruitment of Quiescent β -Cells and Ductal Epithelial Progenitors to Reconstitutive β -Cell Mass, *PLoS ONE*, 5: 1-11.
- ❖ Kim W y Egan J, 2008, The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment, *Pharmacological Rev*, 60:470-512.
- ❖ Kushner Jake A, Ciemerych Maria A, Sicinska Ewa, Wartschow Lynn M, Teta Monica, Long Simon Y, Sicinski Piotr y White Morris F, 2005, Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β -Cell Growth, *American Society for Microbiology*, 9: 3752-3762.
- ❖ Lee YS, Shin S, Shigihara T, Hahm E, Liu MJ, Han J, Yoon JW y Jun HS, 2007, Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis, *Diabetes*, 56: 1671-1679.
- ❖ Mahía V.M. y Pérez P.L, 2000, La Diabetes Mellitus y sus complicaciones vasculares: un problema social de salud, *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*, 1(1):68-73.
- ❖ Olvera-Granados Claudia Patricia, Leo-Amador Guillermo Enrique, Hernández-Montiel Hebert Luis, 2008, Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?, *Bol Med Hosp Infant Méx*, 65: 306-324.

- ❖ Presnell JK, Schreibcam MP, 1997, Humason,s Animal Tissue Techniques. 5th Ed. Baltimore, *The Johns Hopkins University Press*, pg 572.
- ❖ Prophet BE, Arrington BJ, Sobin HL, MD, 1995, Métodos Histotecnológicos, *AFIP*, pg 153-154.
- ❖ Ramírez-Luna H, 2011, Efecto de *Cucurbita ficifolia* Bouché y *Psacalium Peltatum* HBK Cass sobre la expresión de marcadores inflamatorios en hígado de ratón, Proyecto de Investigación UAM-I.
- ❖ Rane SG y Reddy EP, 2000, Cell cycle control of pancreatic beta cell proliferation, *Front Biosci*, 5:D1-19.
- ❖ Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. 2004, Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots, *Planta Med*, 70, 414-420.
- ❖ Román-Ramos R, Alarcón-Aguilar FJ, Lara A, Flores JL, 1992, Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants, *Arch Med Res*, 23: 105-109.
- ❖ Román-Ramos R, Almanza-Pérez JC, Fortis-Barrera A, Angeles-Mejía S, Banderas-Dorantes TR, Zamilpa-Alvarez A, Diaz Flores M, Jasso I, Blancas-Flores G, Gómez J y Alarcón-Aguilar FJ, 2012, Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of a Hypoglycemic Fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouche in Streptozotocin-Induced Diabetes Mice, *The American Journal of Chinese Medicine*, 40(1): 1-14. DOI:10.1142/S0192415X12009634.
- ❖ Sánchez-Barriga JJ, 2010, Mortality trends from diabetes mellitus in the seven socioeconomic regions of Mexico 2000-2007, *Rev Panam Salud Pública*, 28(5): 368-75.

- ❖ Schiffrin EL, 2003, Efectos cardiovasculares de los receptores activadores del proliferador de peroxisomas (PPAR) en hipertensión, *Boletín del Consejo Argentino de H. T. A*, 2: 14-18.
- ❖ Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ, 2010, Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030, *Diabetes Res Clin Pract*, 87(1):4-14.
- ❖ Stevens A, Lowe J, Young B, 2003, Wheater. Histopatología básica, 4ª Edición, Editorial Elsevier, pg: 181-187.
- ❖ Swenne I, 1982, The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells, *Diabetes*, 31(9): 754-60.
- ❖ Torres Seco Fernando, 2002, Manual de técnicas en Histología y Anatomía Patológica, Ed Ariel, 1ª Edición, Barcelona España, pg 77.
- ❖ Vambergue Anne y Fajardy Isabelle, 2011, Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight, *World J Diabetes*, 2(11): 196-203.
- ❖ Wang DC, Xiang H, Li D, Gao HY, Cai H, Wu LJ, Deng XM, 2008, Purine-containing cucurbitane triterpenoids from *Cucurbita pepo* cv dayangua, *Phytochemistry*, 69: 1434-1438.
- ❖ Xia T y Wang Q, 2006, D-Chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats, *J Pharm Pharmacol*, 58: 1527-1532.
- ❖ Xia T y Wang Q, 2007, Hypoglycaemic role of *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats, *J Sci Food Agri*, 87: 1753-57.

❖ Zimmet P., Alberti K, Shaw J, 2001, Global and societal implications of the diabetes epidemic, *Nature*, 414: 782-787.