



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

***Cucúrbita ficifolia* Bouché y su efecto sobre la expresión
de IL-6 durante la diferenciación en la línea celular murina
3T3-L1**

TESIS

Para obtener el título de
Química Farmacéutico Biológica

PRESENTA

Miguel Ángel Sandoval Vázquez

ASESOR:

M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rebeca García Macedo



FES Zaragoza, CDMX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

Este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo del M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez, que fue un excelente profesor que tuve en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, ya que él fue el que me presentó en el IMSS centro médico siglo XXI con el Dr. En C. Adolfo Chávez Negrete y Dr. Cruz, encargado del área de investigación en Bioquímica.

Quiero agradecerle en especial a la Dra. Rebeca García Macedo por dejarme trabajar en su línea de proyecto, por ser mi asesora y por su gran apoyo tanto moral como académico. Ya que sin ella no hubiera logrado adquirir tantos conocimientos en la área de bioquímica clínica.

A mis padres María Elena Adela Vázquez Castellón y Miguel Ángel Sandoval Ramírez quiero agradecerles también mucho por su apoyo tanto afectivo como económico. Porque sin ellos no hubiera podido completar mis estudios y gracias a ellos soy la persona que hoy soy.

También quiero agradecerle a todos los compañeros de la unidad, ya que sin ellos no hubiera aprendido tanto en cuanto a instrumentos o técnicas empleadas en el laboratorio.

Dedicatoria

Este trabajo va especialmente dedicado para mis padres, porque me han apoyado en cada momento de mi vida y me han demostrado que todo se puede lograr con disciplina y esfuerzo. Gracias los amo mucho.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Obesidad.....	3
2.1.1 La obesidad como proceso inflamatorio.....	3
2.1.2 Aumento de la ingesta calórica.....	6
2.1.3 Menor gasto calórico.....	6
2.1.4 Co-morbilidades.....	7
2.1.5 Evaluación clínica.....	9
2.1.6 Diagnósticos.....	10
2.2 Definición de diabetes.....	12
2.2.1 Signos y síntomas.....	13
2.2.2 Clasificación.....	14
2.2.3 Diabetes tipo 1 (DT1).....	14
2.2.4 Diabetes tipo 2 (DT2).....	15
2.2.5 Prevalencia de DT2.....	16
2.2.6 Diabetes gestacional.....	17
2.2.7 Otros tipos específicos de diabetes.....	17
2.2.8 Factores de riesgo.....	17
2.3 Tejido adiposo.....	18
2.3.1 Secreción de proteínas que participan en el metabolismo de triglicéridos.....	20
2.3.2 Secreción de factores con función endocrina.....	22
2.3.3 Peroxisoma proliferador activado de receptor gamma (PPAR γ).....	23
2.3.4 Ligandos endógenos naturales y en la dieta de PPAR γ	24
2.3.5 Tejido adiposo patogénico.....	25
2.4 Citocinas.....	30
2.4.1 IL-6.....	30
2.4.2 Adiponectina.....	33
2.5 Plantas medicinales.....	34
2.5.1 <i>Cucurbita ficifolia Bouché</i>	34
2.5.2 Descripción botánica.....	35
2.5.3 Distribución geográfica.....	35
2.5.4 Componentes químicos.....	36
2.5.5 Uso medicinal.....	36
3. Planteamiento del problema.....	37
4. Hipótesis.....	39
5. Objetivos.....	40
6. Material y Métodos.....	41
6.1 Metodología.....	43
6.2 Obtención del extracto.....	43

6.3 Estandarización del extracto de <i>C. ficifolia</i>	43
6.4 Cultivo celular.....	44
6.5 Tinción de lípidos con rojo oleoso.....	45
6.6 Extracción de ARN.....	45
6.7 Síntesis de cDNA.....	46
6.8 PCR en tiempo real.....	46
6.9 Determinación de la proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo mediante el método de ELISA	47
7. Resultados	48
7.1 Expresión del ARNm de PPRy en células 3T3-L1.....	48
7.2 Expresión del ARNm de adiponectina.....	50
7.3 Expresión del ARNm de IL-6.....	52
7.4 Proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo.....	54
7.5 PPRy, adiponectina, IL-6 y la proteína de IL-6 liberada en adipocitos maduros tratados con el extracto de <i>C. ficifolia</i> durante 48 horas.....	56
7.6 Lípidos.....	57
8. Discusión	61
9. Conclusiones	66
10. Perspectivas	67
11. Referencias	68

Glosario

AGL: Ácidos grasos libres

Apo E: Apolipoproteína E

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASP: Por sus siglas en inglés (acylation stimulating protein) Proteína estimuladora de acilación

CRP: Por sus siglas en inglés (C reactive protein) Proteína C reactiva

C.ficifolia: *Cucúrbita ficifolia Bouché*

DG: Diabetes gestacional

DT1: Diabetes tipo 1

DT2: Diabetes tipo 2

DQI: D-quiró-inositol

ECG: Electrocardiograma

ECV: Enfermedades cardiovasculares

FABP: Por sus siglas en inglés (fatty acid binding protein) Proteína que se une a ácidos grasos

GLUT-4: Transportador de glucosa 4

HDL: Por sus siglas en inglés (high density lipoprotein) Lipoproteínas de alta densidad

HNF-1 α : Por sus siglas en inglés (Hepatocyte nuclear factor-1 alpha) Factor nuclear 1 alfa de hepatocito

HPLC: Por sus siglas en inglés (high performance liquid chromatography) Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

HTA: Hipertensión arterial

IA-2: Por sus siglas en inglés (islet antigen-2) Antígeno de islote 2

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

IRS-1: Sustrato del receptor de insulina 1 (por sus siglas en inglés insulin receptor substrate 1)

Lp: Leptina

LDL: Por sus siglas en inglés (low density lipoprotein) Lipoproteínas de baja densidad

LPL: Lipoproteína lipasa

MFGs: Macrófagos

MEMD: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco

MCP-1: Por sus siglas en inglés (monocyte chemotactic protein-1) Proteína quimioatrayente de macrófagos tipo 1

mM: Milimolar

OMS: La Organización Mundial de la Salud

oxLDL: Por sus siglas en inglés (Oxidized low-density lipoprotein) Lipoproteína de baja densidad oxidada

PENC-ATP III: Educación Nacional del colesterol-Tabla de Tratamiento para Adultos III

pb: pares de bases

PBS: Por sus siglas en inglés (phosphate buffered saline) solución salina amortiguada por fosfatos

PCB: Proteína cinasa B

PCR: Por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction) Reacción en cadena de la polimerasa

PPR γ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma

RI: Resistencia a la insulina

RAAS: Renina-angiotensina-aldosterona sistema

SAHOS: Síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño

SM: Síndrome Metabólico

TAV: Tejido adiposo visceral

TAS: Tejido adiposo subcutáneo

TG: Triglicéridos

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

SNC: Sistema nervioso central

SOCS3: Supresor 3 de señalización de citocinas

ST: Suero de ternera

TA: Tejido adiposo

TAS: Tejido adiposo subcutáneo

UAM-I: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

VLDL: Por sus siglas en inglés (very low density lipoprotein) lipoproteína de muy baja densidad

1. Introducción

La obesidad es un problema global asociado a una serie de alteraciones metabólicas y al desarrollo de enfermedades crónicas como diabetes tipo 2 (DT2), enfermedades cardiovasculares, hipertensión entre otras. El balance metabólico normal se mantiene a través de un sistema homeostático complejo que involucra múltiples tejidos y órganos.^{1,2}

En años recientes se ha identificado al adipocito no sólo como una célula que se encarga de almacenar energía bajo la forma de triglicéridos en períodos de abundancia nutricional y liberarlos bajo la forma de ácidos grasos libres durante períodos de privación alimenticia, sino que también es el más grande órgano endocrino en el cuerpo, que secreta citocinas, hormonas, y factores de crecimiento (comúnmente conocidos como adipocinas) que son importantes reguladores paracrinós, autocrinós y endocrinós.³ El tejido adiposo también se cree que desempeña un papel importante en la inflamación crónica de bajo grado asociada con la obesidad y resistencia a la insulina. La obesidad y las células de grasa grandes alteran el patrón de adipocinas secretadas, favoreciendo la liberación de la citocina inflamatoria, interleucina-6 (IL-6), y reduciendo la citocina antiinflamatoria y sensibilizante a la insulina, adiponectina.⁴

El aumento de volumen de los adipocitos se acompaña de mayor secreción de ácidos grasos libres (AGL), del factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucinas 1 (IL-1 β) y 6 (IL-6) y disminuye la secreción de adiponectina, entre otros. Los AGL, IL-1 β y el TNF α provocan resistencia a la insulina en el propio tejido graso y en el músculo esquelético, aumentan los depósitos lipídicos en los hepatocitos, alteran la función endotelial y de las células beta del páncreas. Esto explica la asociación de la obesidad con el Síndrome Metabólico.⁵

Durante el desarrollo de la obesidad se incrementa la masa de adipocitos, que se propicia por un aumento en la diferenciación de adipocitos y por acumulación de lípidos en adipocitos ya existentes. Es importante conocer cuáles son los mecanismos que intervienen en la instalación de dicha condición para controlar su desarrollo.

En el presente trabajo se pretende investigar el efecto de un extracto acuoso del fruto de *Cucúrbita ficifolia* Bouché (***C.ficifolia***) durante la diferenciación a adipocitos en la línea celular 3T3-L1, donde este extracto presenta un compuesto conocido como D-quiró-inositol (DQI), además de otros compuestos como cucurbitacinas, lecitinas, mio-inositol, calcio, hierro, ácido ascórbico y tiamina. En éste estudio se pretende conocer si el extracto acuoso de ***C.ficifolia*** modifica la expresión del ARNm de IL 6 y de adiponectina por medio del método de PCR en tiempo real, así como también si el extracto tiene efecto sobre la excreción de IL-6.

La característica principal por lo que se seleccionó este fruto comestible es porque existen referencias en la literatura que demuestran que este fruto tiene actividad hipoglucemiante, antiinflamatoria y antioxidante que podría ayudar a las personas con obesidad y DT2, pero en adipocitos maduros nuestro grupo demostró que el tratamiento con el extracto por 48 horas incrementó la expresión de IL-6, a pesar de que también aumenta la adiponectina, que es un regulador de la insulina y antiinflamatorio, en cambio IL-6, como citocina proinflamatoria, se ha encontrado que inhibe la secreción de insulina estimulada por la glucosa, donde concentraciones elevadas de glucosa durante años precede a la DT2. No todos los efectos de IL-6 son negativos, se ha investigado su participación en la oxidación de ácido grasos.

2. Marco teórico

2.1 Obesidad

El sobrepeso y la obesidad están asociados con una variedad de estados de enfermedad crónica, incluyendo enfermedades cardiovasculares (ECV), la diabetes tipo 2 y ciertos tipos de cáncer. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que alrededor de un tercio de la enfermedad coronaria y de accidente cerebrovascular isquémico son casos atribuibles al exceso de adiposidad.⁶

2.1.1 La obesidad como proceso inflamatorio

La inflamación constituye una respuesta fisiológica del organismo ante las infecciones o heridas, que tiene como fin el restablecimiento de la homeostasis. En general se considera que dicha respuesta es benéfica ya que, entre otras, proporciona protección controlada contra las infecciones. La obesidad se acompaña frecuentemente de un cierto grado de inflamación, denominada inflamación crónica de baja intensidad, y a la que hasta ahora no se le ha encontrado un efecto positivo. Se considera que las patologías que cursan con inflamación crónica de baja intensidad, y que no se producen como consecuencia de infecciones o daños tisulares, podrían deberse a eventos relacionados con el ambiente y las condiciones de vida, tales como una dieta con alto contenido calórico, el sedentarismo, la exposición a determinados compuestos tóxicos y el envejecimiento.^{7,8}

La obesidad se ha definido como un estado de inflamación crónica, ya que se ha logrado verificar la presencia de macrófagos (MFGs) infiltrados en el tejido adiposo (TA). Dicha infiltración podría deberse a la muerte de las células grasas hipertrofiadas y/o a una

hipersecreción por parte del TA de citocinas proinflamatorias, tal como la proteína quimioatrayente de macrófagos por sus siglas en inglés (MCP-1).^{9,10}

El TA está constituido en un 50% por adipocitos y el resto por constituyentes vasculares, fibroblastos, células endoteliales, preadipocitos y MFGs.¹¹ Estos últimos constituyen entre 5 y 10% del total de las células presentes en el TA, pero la ganancia de peso inducida por la dieta genera una significativa infiltración de MFGs que contribuye con más del 60% de las células halladas en ese tejido.¹⁰ Estos MFGs en el TA humano fueron informados por primera vez en el año 2000 por Bornstein y cols,¹² quienes confirmaron su ubicación mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas empleando anticuerpos anti-CD68 o α -anti-quimiotripsina. Los MFGs se encontraron más frecuentemente en contacto directo con los adipocitos maduros del TA visceral (TAV) que en el TA subcutáneo (TAS). Luego, Xu y Weisberg, informaron que el TA en ratones obesos está caracterizado por la infiltración de MFGs, y que estos son una importante fuente de factores de inflamación.¹³ Estos investigadores consideraron la posibilidad de que la fuente celular de los cambios inflamatorios que se dan en el TA pudieran ser, además del adipocito, las células reticuloendoteliales o los preadipocitos.¹⁴

Los resultados encontrados en las investigaciones realizadas por Xu y por Weisberg, ponen en consideración la existencia de un modelo que toma en cuenta la infiltración de MFGs al TA, y la interacción entre los adipocitos y los MFGs como parte de los mecanismos fisiopatológicos que permiten el establecimiento de la resistencia a la insulina (RI) y la diabetes tipo 2 (DT2). Adicionalmente, plantean que es probable que el deterioro al endotelio, producto del daño oxidativo resultante de un marcado ambiente lipolítico, juega un papel importante en el reclutamiento de los MFGs similar al observado en la aterosclerosis.¹⁴ Al respecto, Cinti y Strissel sugieren que la muerte de los adipocitos, la cual se relaciona con la hipoxia que tiene

lugar cuando el TA se expande en un periodo breve de tiempo, atrae a los MFGs para remodelar este tejido, eliminando las células muertas y retirando su contenido lipídico potencialmente citotóxico.^{15,16} Se ha demostrado que la hipoxia podría participar activamente en el desarrollo de inflamación asociada a la obesidad, con un notable papel en la alteración de la secreción de adipocinas, en el aumento en la expresión de genes proinflamatorios y en la muerte de los adipocitos.¹⁷ Cuando existe obesidad, debido al exceso de grasa, y en particular el acúmulo a nivel visceral, el TA segrega cantidades mucho más elevadas de adipocinas, con lo que se crea un “ambiente inflamatorio”, con incremento en especial en las concentraciones del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), resistina, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), leptina (Lp), fibrinógeno y componentes del renina-angiotensina-aldosterona sistema (RAAS).¹³ Algunas de estas adipocinas, sobre todo la Lp, activan a las células endoteliales y a la acumulación de MFGs en el TA, los cuales liberan moléculas proinflamatorias, entre ellas el TNF- α , lo que hace perpetuar el estado de inflamación descrito en la obesidad.^{11,14}

Con las investigaciones en ratones realizadas por Xu y Weisberg se comenzó a clarificar el rol de los adipocitos como células hormonales y secretoras de citocinas. En esas investigaciones, el incremento de la adiposidad en los ratones empleados correlacionó fuertemente con la expresión en el TA de genes característicamente expresados por los MFGs, y dicha correlación se hizo más fuerte en el TAV que en el TAS, encontrando, además, que el tamaño del adipocito y el peso corporal total se comportaron como fuertes predictores del número de MFGs maduros hallados.^{10,13}

2.1.2 Aumento de la Ingesta Calórica

Condiciones y patologías asociadas: En la mujer, es frecuente el inicio de la obesidad con un aumento de ingesta durante el embarazo. También puede aparecer obesidad en relación a trastornos psiquiátricos como ansiedad, compulsión, depresión o con algunos tratamientos (antidepresivos tricíclicos). Existen raros casos de lesiones hipotalámicas que comprometen los centros reguladores del apetito.¹⁸

Genética: En ratas genéticamente obesas (Ob) se demostró un déficit de Lp. Ya que es un péptido (hormona) producido en el tejido adiposo y que regula la ingesta alimentaria y el gasto energético a nivel hipotalámico. Al inhibir el neuropéptido Y (NPY) (que es un potente orexígeno), reduce la ingesta y estimula el SN simpático por lo que aumenta la termogénesis (gasto calórico). Sin embargo, la inmensa mayoría de los obesos tienen altos niveles de Lp lo que es congruente con el aumento de la masa grasa y con una probable resistencia a la acción de la Lp. Existen no más de 10 casos en el mundo en que se ha encontrado un déficit de Lp y su administración ha tenido buen efecto en la mejoría de la obesidad. Sin embargo, hay mucho interés en investigar otros péptidos y neurotransmisores (galanina y otros) cuya función en la regulación del peso corporal podría tener una base genética. Los estudios en gemelos han demostrado que la herencia es importante, probablemente como un factor de susceptibilidad para el desarrollo de la obesidad cuando otros factores asociados y el ambiente la favorecen.¹⁹

2.1.3 Menor Gasto Calórico

- Factores ambientales: Para muchos autores la reducción de la actividad física es la principal causa del aumento de la obesidad en el mundo occidental. La genética estaría condicionando una susceptibilidad y la ingesta promedio a nivel de poblaciones no ha

variado tanto en las últimas décadas. En cambio, el sedentarismo sí se ha acentuado con una menor exigencia física en la actividad laboral y mucha recreación sin ejercicio (TV, automóvil, etc...).¹⁹

- **Patologías asociadas:** El hipotiroidismo reduce el gasto y puede favorecer la obesidad, pero como causa única y principal es muy poco frecuente (< 5% en mujeres y muy rara en hombres). Las patologías del aparato locomotor también reducen el gasto por limitación en la actividad física.¹⁹
- **Genética:** En los últimos años se ha estudiado en modelos animales el papel de los receptores beta 3 adrenérgicos y de las proteínas desacoplantes, que también están presentes en el ser humano, en la regulación de la termogénesis facultativa. Estos sistemas estimulan las pérdidas de calor con una menor eficiencia en la síntesis de ATP. Desde hace muchos años se ha descrito que existen sujetos más "eficientes" (y otros menos) para disponer de la energía, de tal manera que ellos tendrían una mayor susceptibilidad a aumentos de peso frente a sobrecargas calóricas (mientras otros la disiparían como calor sin subir tanto de peso).

Los estudios clínicos señalan en forma concordante que el síndrome de la obesidad es multicausal y con frecuencia se reconocen varias causas en el mismo individuo.¹⁹

2.1.4 CO-MORBILIDADES

La obesidad aumenta los costos de salud individual y social, disminuye la autoestima, provoca discriminación social, laboral y eleva los riesgos de desarrollar enfermedades crónicas.¹⁹

Padecimientos relacionados con el exceso de peso:

- Osteoartritis (rodillas, tobillos, columna lumbar)
- Disnea (mala tolerancia al ejercicio)
- Síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño (SAHOS)
- Reflujo gastroesofágico
- Hernias (inguinales, incisionales)
- Intertrigo y micosis en pliegues cutáneos
- Incontinencia urinaria (especialmente en la mujer)
- Várices y edema en piernas
- Pseudotumor cerebral
- Enfermedades psiquiátricas (depresión, bulimia)

Alteraciones metabólicas relacionadas con el exceso de peso:

- Diabetes tipo 2 (e intolerancia a la glucosa)*
- Hipertensión arterial *
- Dislipidemias *
- Estado-hepatitis no alcohólica *
- Síndrome de ovario poliquístico en mujeres en edad fértil *
- Aumento de factores pro-trombóticos (PAI-1, fibrinógeno) *
- Gota (hiperuricemia) *
- Enfermedad aterosclerótica (coronaria, cerebral y periférica) *
- Cáncer (mama, colon)
- Litiasis biliar

(*) Están relacionadas a resistencia a la insulina e hiperinsulinemia y algunos de ellos conforman el llamado síndrome metabólico (SM) que es una condición clínica, en la cual la mayoría de sus componentes se relacionan con resistencia a la insulina, con un riesgo aumentado de presentar diabetes y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Estudios en poblaciones nórdicas han determinado que el SM aumenta por 2 el riesgo de enfermedades vasculares y por 3 el de enfermedad coronaria.¹⁹

2.1.5 Evaluación clínica de obesidad

Anamnesis: Se debe determinar la historia del peso, las alteraciones de la conducta alimentaria, la actividad física y las co-morbilidades asociadas.²⁰

Examen Físico: El examen debe ser completo, buscando signos de patologías asociadas. La acantosis nigricans en cuello y axilas es signo de hiperinsulinemia.²⁰

➤ Medir peso y talla para calcular el índice de masa corporal (IMC) y el perímetro de cintura.

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso}(kg)}{\text{altura}^2(m)}$$

Laboratorio: Es conveniente evaluar patologías endocrinológicas asociadas a la obesidad como hipotiroidismo. Otros exámenes según el caso particular y dependiendo del tratamiento que se vaya a indicar.²⁰

- Glucemia en ayunas y eventualmente, una prueba de tolerancia a la glucosa oral para diagnosticar diabetes o prediabetes.
- Perfil de lípidos con Colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad (por sus siglas en inglés cholesterol-low density lipoproteins (C-LDL)),

colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (por sus siglas en inglés cholesterol-high density lipoproteins (C-HDL)) y triglicéridos. La dislipidemia más frecuente en obesos es un leve a moderado aumento del C-LDL, con franco aumento de triglicéridos y disminución del C-HDL (la llamada “dislipidemia aterogénica”).

- Pruebas hepáticas. Un hígado graso puede acompañarse de elevación de transaminasas.
- Bioimpedanciometría para cuantificar la masa grasa
- Calorimetría indirecta para determinar el gasto energético en reposo y estimar el total según la actividad física del paciente. Para una mejor prescripción de la dieta hipocalórica.
- Electrocardiograma (ECG) de esfuerzo para descartar insuficiencia coronaria, arritmias o aumentos mayores de la presión arterial, para la prescripción del ejercicio físico.
- Ecotomografía abdominal si hay alteraciones hepáticas.
- Polisomnograma si hay historia de apneas del sueño.

2.1.6 Diagnósticos

El diagnóstico de obesidad se determina según el IMC y su distribución, con el perímetro de cintura como se puede ver en la tabla 1.²⁰

El perímetro de cintura se considera elevado: Hombres > 102 cm

Mujeres > 88 cm

IMC	
Sobrepeso	25,0 – 29,9
Obesidad grado I	30,0 – 34,9
Obesidad grado II	35,0 – 39,9
Obesidad grado III (mórbida)	≥ 40

Tabla 1. Índice de Masa Corporal (IMC)

Además, se deben consignar los diagnósticos de las patologías asociadas (Tabla 2). Entre ellas está el Síndrome Metabólico, cuyo criterio diagnóstico más usado es el del Programa de Educación Nacional del Colesterol-Tabla de Tratamiento para Adultos III (PENC-ATP III) (USA). Según éste, se diagnostica Síndrome Metabólico:

Si existen 3 o más elementos siguientes:

- Obesidad abdominal (perímetro cintura > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres).
- Triglicéridos ≥ 150 mg/dl, o en tratamiento - C-HDL < 40 en hombres y < 50 mg/dl en mujeres, o en tratamiento.
- P. arterial ≥ 130/85 mm de Hg, o en tratamiento.
- Glucemia en ayunas ≥ 100 mg/dl, o en tratamiento.²⁰

Patologías Asociadas a Obesidad (RR = Riesgo Relativo)		
Muy Alto (RR x 3)	Moderadamente Alto (RR x 2 - 3)	Alto (RR x 1 - 2)
Diabetes tipo 2	Enfermedad Coronaria	Cáncer (mama, endometrio, colon)
Colelitiasis	Hipertensión arterial	Ovario poliquístico
Dislipidemia	Osteoartritis	Infertilidad
Resistencia a la insulina	Gota	Lumbago
Apnea del sueño		Riesgo anestésico
Disnea		Defectos fetales (por obesidad materna)

Tabla 2. Patologías Asociadas a Obesidad

2.2 Definición de diabetes

Una de las patologías asociadas con la obesidad es la diabetes, que es una enfermedad caracterizada por un estado de hiperglucemia crónico que se presenta junto con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, debido a la ausencia o disminución en la secreción y/o acción de la insulina. Los efectos de la diabetes a largo plazo incluyen disfunción y falla en varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. En el desarrollo de la diabetes están involucrados varios procesos patogénicos, lo cuales van desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, con la consecuente deficiencia en la secreción de insulina, hasta la generación de resistencia a insulina. La base de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas es la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana, resultado de la inadecuada secreción o disminución en la respuesta de los tejidos a la insulina en uno o más puntos de las vías de acción de esta hormona. El deterioro en la secreción de insulina y los defectos en su acción

frecuentemente coexisten en el mismo paciente, no siendo clara cuál es la primera causa de la hiperglucemia.^{21,22}

2.2.1 Signos y síntomas

La diabetes presenta síntomas característicos tales como: polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, visión borrosa, náuseas, vómito, debilidad, incremento en la susceptibilidad a infecciones (por ejemplo vaginitis), irritabilidad, apatía, impotencia (en hombres), los signos que llevan al diagnóstico de la diabetes son, altos niveles de glucosa en sangre y orina, cetoacidosis y coma.²³

Los efectos a largo plazo de la diabetes incluyen el desarrollo progresivo de complicaciones específicas; por ejemplo, las consecuencias vasculares de la diabetes consisten en anormalidades macrovasculares (macroangiopatía) y microvasculares (microangiopatía). Las anormalidades macrovasculares resultan en aterosclerosis con incremento en enfermedades cerebrovasculares e infarto del miocardio. Las afecciones neuropatológicas afectan al sistema autónomo y a los nervios periféricos y, junto con la insuficiencia circulatoria aterosclerótica en las extremidades, puede producir ulceración crónica y gangrena, en particular en los pies. Las anormalidades microvasculares comprenden cicatrización proliferativa de la retina (retinopatía diabética) y enfermedad renal (nefropatía diabética). Las complicaciones microvasculares se explican en gran parte por la hiperglucemia crónica y algunas veces pueden prevenirse controlando esta última. Sin embargo, es poco probable que el control glucémico ayude en el caso de las anormalidades macrovasculares. Los pacientes con diabetes tienen alta incidencia de enfermedades ateroscleróticas cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares; frecuentemente hipertensión, alteraciones en el metabolismo de

lipoproteínas y enfermedades dentales. El impacto social y emocional de la diabetes, así como la demanda de terapia efectiva, pueden provocar disfunción psicosocial en los pacientes y sus familiares.^{23,24}

2.2.2 Clasificación

Se distinguen 4 tipos de diabetes: tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos específicos, entre los que se encuentran: defectos genéticos de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina y asociada a otros síndromes, tales como: Down, Klinefelter, Cushing y Turner.^{21,22}

2.2.3 Diabetes tipo 1 (DT1)

Antes conocida como diabetes dependiente de insulina o diabetes juvenil. La DT1 implica destrucción de las células β pancreáticas, resultando en ausencia de insulina. Los marcadores de la destrucción inmune de las células β pancreáticas incluyen auto anticuerpos a insulina, descarboxilasa de ácido glutámico y fosfatasas de tirosina (IA-2 y IA-2 β). La enfermedad también tiene una fuerte asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad. El índice de este tipo de diabetes es realmente variable, presentándose principalmente en niños y en algunos adultos. Algunos pacientes, principalmente niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como la primera manifestación de la enfermedad. Otros, con una moderada hiperglucemia en ayuno que rápidamente cambia a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis, en presencia de alguna infección o de estrés. La destrucción autoinmune de las células β pancreáticas tiene múltiples predisposiciones genéticas que también están relacionadas con factores ambientales. Aunque los pacientes con DT1 son en su mayoría delgados, la presencia de obesidad es incompatible con el diagnóstico. Estos pacientes son propensos a otros

desórdenes autoinmunes, tales como: enfermedad de Graves o Addison, tiroiditis de Hashimoto y anemia.^{21,22}

2.2.4 Diabetes tipo 2 (DT2)

Antes conocida como diabetes no dependiente de insulina o diabetes de adultos. La DT2 se caracteriza por obesidad y resistencia a la insulina con cierto grado de disfunción en las células β pancreáticas. Los pacientes que padecen este tipo de diabetes regularmente no requieren el uso de insulina en su tratamiento. Los pacientes que no son obesos, de acuerdo al criterio índice de masa corporal, tienen un alto porcentaje de grasa en la región abdominal de su cuerpo. La cetoacidosis raramente se presenta de manera espontánea en este tipo de diabetes pero se encuentra usualmente en asociación con otras enfermedades, como por ejemplo una infección. Esta forma de diabetes regularmente no se diagnostica rápido, ya que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en sus etapas tempranas no alerta al paciente con los síntomas clásicos de la diabetes. Los pacientes con DT2 presentan aún células β pancreáticas funcionales, sin embargo, la insulina secretada es insuficiente para compensar los niveles de glucosa sanguínea después de la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos o grasas. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes se incrementa con la edad, obesidad y la ausencia de actividad física. Está frecuentemente asociada con una fuerte predisposición genética, más que para la DT1. A pesar de ello, la genética de esta forma de diabetes es aún poco clara.^{21,22}

La DT2 implica, por lo tanto, alteración en la secreción de insulina y aumento de la resistencia a la acción de esta hormona, la cual en sus inicios la célula β pancreática deja de responder con incrementos adecuados en la secreción de insulina a los aumentos de la glucosa. Después, se produce elevación en la secreción de insulina, la cual se observa muy

frecuentemente cuando existe la obesidad, exceso de consumo de grasas o inactividad física. En esta etapa intermedia el incremento en la secreción de insulina puede todavía ser suficiente, de tal suerte que la tolerancia a la glucosa se mantiene en límites normales; pero después progresa la deficiencia secretora de insulina y se genera resistencia a la insulina.²⁵ Con el paso del tiempo, el deterioro en la secreción de insulina empeora la tolerancia a la glucosa, aumentando la producción hepática de glucosa muy por encima de su requerimiento y se presenta la hiperglucemia en ayunas.²⁶

2.2.5 Prevalencia de DT2

La DT2 la padecen entre el 80 y el 95% de los pacientes con diabetes. Sin embargo, existen notables variaciones de acuerdo a raza, país, grupo socioeconómico y presencia de otras condiciones como obesidad, dislipidemia e hipertensión.²⁷

La DT2 es el tipo de diabetes más común y generalmente aparece en la edad adulta, es decir, después de los 40 años de edad.^{21,22}

Se estima que el 50% de los individuos con DT2 no han sido diagnosticados aún y el 20% de los pacientes que se diagnostican con DT2 presentan datos de complicaciones crónicas en el momento del diagnóstico. La DT2 es la enfermedad endócrina más frecuente y de las principales causas de mortalidad en la sociedad contemporánea; por sí misma es un problema de salud pública frecuente y creciente en México. En el ámbito mundial el predominio de la DT2 ha incrementado dramáticamente en los últimos años debido a la falta de actividad física, obesidad y cambios en los hábitos alimenticios.²⁸

2.2.6 Diabetes gestacional

La Diabetes gestacional (DG) se puede definir como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con reconocimiento durante el embarazo. La definición aplica sin considerar factores responsables como la insulina, la modificación en la dieta o si la condición persiste después del embarazo. En la mayoría de los casos de DG, el metabolismo de la glucosa llega a ser adecuado después del parto.^{21,22}

2.2.7 Otros tipos específicos de diabetes

Defectos genéticos de las células β pancreáticas. La forma más común está asociada al Factor nuclear 1 alfa de hepatocito por sus siglas en inglés (HNF-1 α). Una segunda forma se encuentra asociada con mutaciones en el gen de glucocinasa. La tercera forma está asociada con la mutación en el gen HNF-4 α , factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de HNF-1 α .^{21,22}

2.2.8 Factores de riesgo

Algunos de los factores de riesgo más comunes para la diabetes son los siguientes: historia familiar con antecedentes diabéticos (DT1, DT2), historia familiar con enfermedades autoinmunes (DT1), madre muy joven o anciana (DT1), ser mayor de 40 años (DT2), presentar acumulación de grasa en la región abdominal del cuerpo (DT2), altos niveles de colesterol o triglicéridos en sangre (DT2).^{21,22}

Es importante mencionar que la hiperglucemia, genera un estado de glucotoxicidad, que induce procesos inflamatorios, acelerando las complicaciones de la diabetes, que afectan ojos,

riñones, nervios y vasos sanguíneos, por mecanismos que aún no son claros. El estado inflamatorio se manifiesta presentando altos niveles de citocinas proinflamatorias y menor cantidad de citocinas antiinflamatorias. La producción de especies reactivas, como peróxido de hidrógeno y radicales superóxido e hidroxilo, se incrementa en la DT2, provocando disminución de la actividad del sistema de defensa antioxidante y por otro lado la generación de radicales libres, que llevan al deterioro de estructuras celulares y de funciones fisiológicas. Esto provoca que el paciente diabético experimente daño endotelial vascular, pierda el control del tono vascular y se vuelva hipertenso, entre otros efectos.^{29,30}

Desde la década pasada existe evidencia experimental, epidemiológica y clínica que indica un vínculo entre la inflamación y la diabetes tipo 2; dicha relación es establecida por ciertas moléculas características de la respuesta inflamatoria, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el cual es sobre expresado en tejido adiposo de ratones obesos, esto crea el primer indicio de la relación diabetes-inflamación. El TNF- α es una citocina proinflamatoria que activa varias cascadas de señalización, entre las cuales se encuentran inhibidores críticos de la acción de la insulina. Se ha observado que en los ratones obesos que carecen de la función de TNF- α , la sensibilidad a la insulina mejora y la homeostasis de la glucosa, lo cual confirma que la respuesta inflamatoria tiene un papel crítico en la regulación de la acción de la insulina.³¹

2.3 Tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) es el sitio donde el organismo guarda su principal reserva energética. El adipocito tiene la capacidad de acumular grasa cuando el aporte energético es excesivo; y de movilizarla cuando el organismo requiere energía. Para esto, la célula adiposa contiene todas las enzimas de la lipólisis y de la lipogénesis y es capaz de modificar su tamaño hasta

20 x su diámetro y varios cientos de veces su volumen. El metabolismo lipídico en el TA es dependiente del requerimiento energético del organismo y está finamente regulado por nutrimentos, señales hormonales y neuronales. El TA blanco no sólo responde a hormonas, sino que también las produce y secreta. Mediante estas señales moleculares el adipocito participa en la regulación de múltiples funciones celulares y se comunica con células de otros tejidos localizadas en órganos distantes, como hipotálamo, páncreas, hígado, músculo esquelético, riñón, endotelio y sistema inmune. En la Figura 1 se indican las moléculas producidas por la célula adiposa, que funcionan como señales endocrinas, paracrinas o autocrinas. De las diversas proteínas secretadas por el adipocito, la Lp es una de las más importantes, ya que a través de esta hormona el TA se comunica con el sistema nervioso central y participa en la regulación neuroendocrina de la homeostasis energética. Actualmente, han incrementado considerablemente los conocimientos acerca de la función endocrina del tejido adiposo, de la naturaleza de los productos que secreta y de su posible papel en los procesos fisiopatológicos que se desencadenan cuando se presenta un desequilibrio por exceso o por deficiencia extrema del contenido de grasa en el tejido adiposo.³²

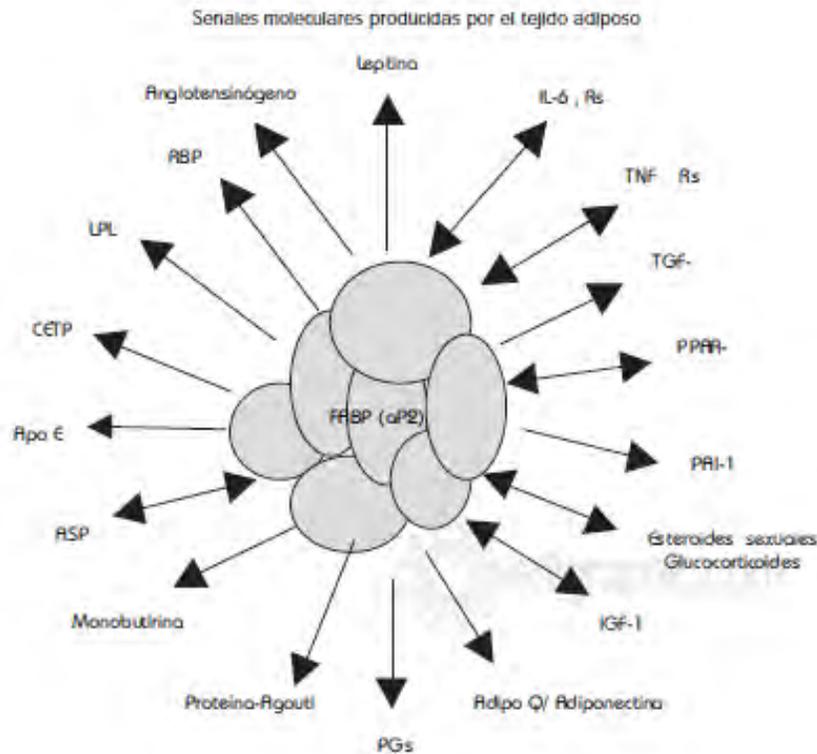


Figura 1. Moléculas expresadas en el tejido adiposo. Hormonas, citocinas y otras moléculas que se producen y secretan por el tejido adiposo claro, implicadas en procesos de regulación metabólica, neuroendocrina, inmunológica y cardiovascular. Abreviaturas: ASP, proteína estimuladora de acilación; Apo E, apolipoproteína E; Adipo Q o adiponectina, proteína del adipocito relacionada al complemento; CETP, proteína translocadora de ésteres de

colesterol; FABP, proteína que se une a los ácidos grasos; IGF-1, factor de crecimiento similar a insulina; IL-6, interleucina 6; LPL, lipoproteína lipasa; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; PG, prostaglandina; PPAR γ , I receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma; RBP, proteína que se une a retinol; Rs, receptores; TGF β , Factor de crecimiento transformante beta; TNF α , Factor de necrosis tumoral alfa. Las flechas de un solo sentido indican efectos endocrinos y las de doble sentido efectos autocrinos y paracrinos.

2.3.1 Secreción de proteínas que participan en el metabolismo de Triglicéridos (TG)

- Lipoproteína lipasa (LPL). Es la enzima que regula el ingreso de los ácidos grasos libres, provenientes de los TG contenidos en las lipoproteínas circulantes, al interior de los adipocitos, se localiza en la superficie luminal de las células endoteliales asociada a glucosaminoglicanos. La expresión génica de LPL es similar en TA de diferente localización corporal. La insulina y los glucocorticoides son los estimulantes fisiológicos que activan a esta enzima. Se considera que LPL en combinación con

los esteroides juega un papel central en la regulación topográfica de la grasa corporal y es determinante en el desarrollo de obesidad visceral.

- Proteína estimuladora de acilación (por sus siglas en inglés (ASP)). Proteína sérica de 14 Kd con potente efecto para estimular la síntesis de TG en el TA. El adipocito humano secreta 3 proteínas de la vía alterna del complemento: C3, factor B y factor D (adipsina). A medida que se generan los AGL por acción de la LPL sobre las lipoproteínas circulantes, simultáneamente se produce ASP, proteína que promueve la síntesis y depósito de TG en el adipocito. En las células circulantes ocurre simultáneamente, lo que sugiere un efecto paracrino de esta proteína. Los niveles séricos de ASP son más elevados en sujetos obesos que en delgados.
- Proteína que se une a ácidos grasos (por sus siglas en inglés (FABP)). Ésta no es una proteína de secreción y se localiza en el citosol del adipocito. También se conoce como aP2, se expresa durante la diferenciación de la célula adiposa y representa el 6% del contenido de proteína total del adipocito maduro. Esta proteína moviliza los AGL en la fase acuosa del citosol y los dirige a los organelos membranosos intracelulares, para su esterificación o su oxidación.
- Apolipoproteína E (apoE). Es una glucoproteína de 35 Kd, componente importante de varias lipoproteínas plasmáticas (remanente de quilomicrón, HDL, VLDL), funciona como ligando para algunos receptores de estas lipoproteínas, se produce en hígado, pero también en otros tejidos como cerebro, glándulas adrenales, macrófagos y células adiposas.³³

2.3.2 Secreción de factores con función endocrina

- Hormonas esteroides. La presencia de estrógenos en el plasma de mujeres postmenopáusicas llevó a descubrir que el TA es un sitio extraglandular importante en la producción de hormonas esteroides. El TA blanco posee dos enzimas importantes para el metabolismo de los esteroides sexuales: la 17 β -hidroxiesteroide óxido-reductasa y la aromatasa dependiente de citocromo P450. La androstenediona producida en corteza adrenal se convierte en testosterona por la óxidoreductasa y esta misma enzima transforma estrógenos y estrona en estradiol. La aromatización de andrógenos a estrógenos también se lleva a cabo en TA. La aromatasa es la enzima responsable de transformar androstenediona en estrona, la tasa de conversión se incrementa con la edad y con obesidad. Además, el TA produce la enzima 11-hidroxiesteroide- β deshidrogenasa, que interconvierte cortisol y cortisona. Incremento en la expresión del gen de esta enzima en TA visceral, se ha señalado como un factor que contribuye a la obesidad androide.
- Angiotensinógeno. Es el sustrato de renina, la cual lo convierte en angiotensina I, el precursor de angiotensina II. Se sintetiza principalmente en el hígado, aunque su ARNm también se encuentra en otros tejidos incluyendo el TA, en donde no se conoce bien su papel fisiológico. Se sugiere que angiotensina II influye en la diferenciación del adipocito. La expresión de angiotensinógeno se incrementa en obesidad y se modifica por el estado de nutrición. Durante la inanición disminuye el nivel de su mensajero, el cual se eleva nuevamente cuando se reanuda la alimentación. Por estas observaciones, se ha postulado que el angiotensinógeno podría participar en la regulación del tamaño de la reserva grasa en respuesta a cambios nutricionales.

- Adiponectina. Es una proteína de secreción similar a la colágena y su gen se expresa en TA. Los niveles de adiponectina en plasma se correlacionan negativamente con el IMC y con la cantidad de grasa visceral. La secreción de la proteína está modulada por insulina, por lo que se piensa que está regulada por factores nutricionales.³⁴

2.3.3 Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR γ).

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) comprenden una subfamilia de los receptores de la hormona nuclear (RHN). En los vertebrados, las proteínas PPAR regulan diversos procesos biológicos tales como la formación de patrones, diferenciación celular y homeostasis metabólica.³⁵

La proteína PPAR γ se expresa predominantemente en el tejido adiposo. El gen da lugar a tres ARNm (PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3), con los ARNm PPAR γ 1 y γ 3 terminan como la misma proteína. El ARNm PPAR γ 2 produce una proteína que contiene un adicional de 28 aminoácidos en el extremo N-terminal. Hasta ahora no ha habido ninguna evidencia de diferencias funcionales entre las isoformas de PPAR γ , pero la evidencia reciente sugiere que el transcrito PPAR γ 2 es el regulador fundamental para adipogénesis.³⁶ Los estudios iniciales en ratones C57BL/6J mostraron que el ARNm PPAR γ 1 y PPAR γ 2 se expresa abundantemente en el tejido adiposo. En humanos Ambos ARNm's γ 1 y γ 2 se expresaron abundantemente en el tejido adiposo, PPAR γ 1 se detectó a niveles más bajos en el hígado y el corazón, mientras que γ 1 y γ 2 se expresaron en niveles bajos en el músculo esquelético.^{38,39} Además, PPAR γ se expresa en altos niveles en el intestino grueso.³⁹

Resultados algo diferentes fueron reportados por Loviscach y cols.,⁴⁰ quienes encontraron que la cantidad de proteína en el músculo PPAR γ fue en promedio de dos tercios de la

presente en la grasa, lo que sugiere que la expresión de PPAR γ también es abundante en el músculo esquelético.

2.3.4 Ligandos endógenos naturales y en la dieta de PPAR γ

En 1995, Forman⁴¹ informó que el metabolito del ácido araquidónico J2 15-desoxi-D12, 14-prostaglandina y metabolitos relacionados eran ligandos de PPAR γ . Un hallazgo un tanto similar se informó por Kliewer.⁴² Además, se demostró que otros ácidos grasos eran agonistas del receptor de PPAR γ , incluyendo el ácido eicosapentanoico, que es ácido graso poliinsaturado que se encuentra en la dieta. También dos de los principales componentes de lípidos oxidados como las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) 9-HODE y 13-HODE se identificaron como ligandos endógenos y activadores de PPAR γ .⁴³ De la evaluación de los estudios realizados hasta el momento, parece probable que el PPAR γ sirve como un receptor para muchos ácidos grasos diferentes, con afinidades similares en K_D = rango 2-50 mM, que en realidad están muy por debajo de las afinidades publicados de la mayor parte de los otros receptores de hormonas nucleares para sus ligandos. Muchos de estos ácidos grasos también se unen a los PPAR α y PPAR β , y en general los ácidos grasos saturados son ligandos débiles de PPAR en comparación con los ácidos grasos insaturados.⁴⁴ Por lo tanto, PPAR γ parece unirse a todos sus ligandos endógenos con baja afinidad, y por lo tanto puede funcionar como un sensor de ácidos grasos generalizado; Sin embargo, es probable que la cantidad intracelular de proteínas de unión a ácidos grasos (FABP intracelular) dentro de las células y la unión de los ácidos grasos libres (AGL) es importante para la actividad real PPAR γ . Estudios de cristalografía de rayos X del dominio de unión del PPAR γ con su ligando han demostrado que tiene un sitio de unión para el ligando, que es al menos dos veces el tamaño del correspondiente en los otros receptores

nucleares. Es significativo que todos los ligandos naturales identificados son ácidos carboxílicos lipófilos. Las características estructurales del sitio de unión a ligando sugieren que el receptor ha evolucionado para reconocer ligandos ácidos que pueden unirse al clúster de residuos polares que participan en la activación del receptor. Esta característica se complementa con el gran volumen del sitio de unión, que puede acomodar una gama de ligandos lipófilos a través de interacciones hidrófobas relativamente no específicos. Por lo tanto, la estructura molecular de PPAR γ es coherente con su papel fisiológico propuesto como un sensor de ácido graso.⁴⁵ Esta sugerencia es corroborada por pruebas que demuestran que los ácidos grasos y las drogas tiazolinedionas (TZD) (agonistas de PPAR γ) tienen los mismos efectos sobre la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos en los preadipocitos.⁴⁶

2.3.5 Tejido adiposo patogénico

La obesidad es considerada un exceso de adiposidad corporal y algunos autores proponen definirla como una enfermedad propiamente dicha,⁴⁷ debido a que si la hipertrofia y la acumulación del TAV ocurren durante un balance calórico positivo, las consecuencias patogénicas pueden tener un efecto desfavorable sobre otros órganos o sistemas, tales como el músculo, el hígado y el páncreas, lo cual puede reflejarse en resultados clínicamente adversos.⁴⁸

El TA puede ser patogénico debido a las consecuencias que por sí sólo conlleva la acumulación de la masa grasa o por su efecto debido a su actividad endocrina e inflamatoria, ya que éste puede generar o ayudar a producir factores inflamatorios, protrombóticos y fibrinolíticos.⁴⁸

Por razones prácticas, el peso corporal se ha utilizado como medida indirecta del grado de adiposidad, que no es fácil medir con las pruebas habituales. El Índice de Masa Corporal (IMC) se emplea en la actualidad para definir obesidad por su buena correlación con el contenido de masa grasa. La Organización Mundial de la Salud (OMS)¹⁹ estableció los valores de referencia de este índice, los cuales permiten clasificar a los sujetos adultos en bajo peso, peso normal, con sobrepeso y obesidad. En cuanto al diagnóstico nutricional en adolescentes, la OMS⁴⁹ propone el empleo de la puntuación Z, para clasificar a este grupo etario en déficit de peso, normal, con sobrepeso y obesidad.

No obstante, con el empleo del diagnóstico nutricional a través del IMC se ha observado la existencia de un fenotipo correspondiente a individuos con peso normal pero metabólicamente obesos; es decir, tienen un IMC normal pero presentan las alteraciones típicas de los pacientes obesos, resistencia a la insulina (RI), adiposidad central, bajas cifras de colesterol de las HDL y concentraciones elevadas de triglicéridos, así como también hipertensión arterial (HTA).⁵⁰ Al mismo tiempo, existen sujetos denominados “obesos metabólicamente sanos”,⁵¹ quienes muestran IMC superior 30 kg.m⁻², pero ninguna de las alteraciones metabólicas típicas de los individuos obesos. En la actualidad se le da más importancia a la distribución del TA con relación al establecimiento de las consecuencias fisiopatológicas que se presentan en la obesidad.

La distribución del TA en el organismo se refiere a la cantidad relativa de grasa en los compartimentos principales en donde se almacena el TA en el cuerpo. Al respecto, la capa de

TA que se localiza entre la dermis y la aponeurosis y fascia de los músculos y que incluye al tejido mamario, se define como TAS, mientras que el que se ubica en el interior del tórax, abdomen y pelvis se denomina TAV.⁵²

Frecuentemente, los sujetos descritos como obesos pero metabólicamente sanos presentan menos cantidad de TAV que los denominados obesos pero con alteraciones metabólicas. Inversamente, los sujetos eutróficos pero metabólicamente alterados frecuentemente presentan más TAV que aquellos con similar peso, pero sin alteraciones metabólicas. Tales hallazgos clínicos son explicados por las diferentes actividades intrínsecas de los diferentes depósitos de grasa.⁵³

El TAV es reconocido como el principal depósito de grasa asociado al aumento en el riesgo de padecer enfermedades metabólicas, ya que se le implica como el tejido que da inicio a la RI debido a que un incremento en el flujo de los ácidos grasos libres (AGL) tanto en el sistema portal como en la circulación general, tiene efectos sobre la captación de glucosa a nivel celular y en el metabolismo de carbohidratos intracelular.⁵⁴

Existen diferencias regionales en la actividad lipolítica del TA y en la movilización de los AGL dentro del mismo. Los depósitos de grasa visceral presentan una mayor actividad lipolítica que los del tejido subcutáneo. Estas diferencias se han relacionado con los niveles de las hormonas reguladoras de la lipólisis, ya que la acción lipolítica de las catecolaminas está disminuida en la grasa subcutánea, pero aumentada en el TAV; a su vez, los efectos antilipolíticos de la insulina y de las prostaglandinas son menores en el tejido visceral o peritoneal que en el subcutáneo.⁵⁵ Diversos estudios sugieren que los adipocitos viscerales

poseen más receptores beta adrenérgicos, por lo que sufren más lipólisis, al presentar una actividad aumentada de la lipasa sensible a hormonas, mientras que la insulina tiene un efecto antilipolítico mayor en aquellos adipocitos sub-cutáneos de mayor tamaño que poseen más cantidad de receptores alfa 2 adrenérgicos.^{56,57}

El TAV y el TAS difieren en la producción de moléculas bioactivas, en la actividad de varios receptores y en los procesos enzimáticos involucrados con el metabolismo lipídico.^{58,59} De igual forma, el TAV muestra mayor actividad metabólica que la que se observa en el TAS.^{60,61} Aun cuando se ha asociado al TAS con un factor protector contra enfermedades metabólicas como la DT2, un exceso de este tejido puede convertirse en patogénico. El efecto “protector” del TAS puede explicarse debido a que si durante un balance calórico positivo ocurre el reclutamiento y proliferación de adipocitos subcutáneos más funcionales, el riesgo de padecer enfermedades metabólicas puede disminuir, ya que este TA funcional provee una mayor y mejor capacidad de almacén de energía (ácidos grasos libres). Sin embargo, si la adipogénesis se altera y los adipocitos subcutáneos se alargan y se convierten en disfuncionales y patogénicos, este tejido finalmente puede contribuir con las alteraciones propias de las enfermedades metabólicas como la DT2.⁵⁸

Tanto el TAS como el TAV pueden contribuir con el establecimiento de la HTA, particularmente cuando se acompaña de hipertrofia del adipocito. Sin embargo, un incremento relativo del TAV tiene un mayor efecto sobre el aumento de la presión sanguínea y esto es posible que se deba al efecto del TAV sobre varios factores del adipocito como lo son la IL-6, la CRP y el TNF- α , los cuales se encuentran involucrados con la disfunción endotelial. De forma general, se puede

decir que el TAV expresa mayor cantidad de adiponectina, IL-6, PAI-1, angiotensinógeno y TNF- α que el TAS, mientras que la Lp se expresa en mayor proporción en el TAS.⁶⁰

Los factores inflamatorios del TA son producidos tanto por los adipocitos como por las células inflamatorias asociadas al TA como lo son los MFGs. Los adipocitos y el TA pueden producir proteínas bioactivas denominadas adipocinas, las cuales constituyen factores secretorios que incluyen las citocinas, los factores de complemento, enzimas, factores de desarrollo y hormonas.^{48,60} Un incremento en la secreción de adipocinas con actividad de citocinas puede relacionarse con la aparición de enfermedades metabólicas, incluyendo la aterosclerosis.^{62,63}

Los factores inflamatorios derivados del TA y que son potencialmente patogénicos, incluyen a las adipocinas con actividad de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, adipina, leptina, TNF- α , MCP-1, entre otros), los reactantes de fase aguda (PAI-1 y posiblemente CRP), proteínas del sistema de complemento alterno (adipina, proteína estimulante de acilación y componente 3 del complemento), adipocinas quimioatrayentes/quimiotácticas (TNF- α , MCP-1, entre otros), eicosanoides/prostaglandinas (Prostaglandinas E2) y la disminución en la secreción de factores antiinflamatorios (adiponectina, IL-10, óxido nítrico, entre otros).^{48,60,63,64}

La obesidad abdominal puede ser medida por medio del perímetro o Circunferencia de Cintura (CC), que ha demostrado poseer alta correlación con enfermedades cardiovasculares.^{65,66} En adultos, la obesidad central está definida por la medición de la circunferencia abdominal, de acuerdo con valores establecidos por regiones del mundo (Tabla III). Se ha demostrado que al aumentar el grado de obesidad se incrementa el riesgo de presentar otras complicaciones, y estos son distintos en los diferentes grupos poblacionales.⁶⁷⁻⁶⁹ Los latinoamericanos y los

asiáticos comparten los mismos puntos de cortes de CC, aunque difieren de los norteamericanos o europeos.⁷⁰ Con respecto a los criterios y valores de referencia para el diagnóstico de obesidad central en niños y adolescentes, se emplean curvas de percentiles de la CC ajustadas por edad y género. Al respecto, se han establecido diferentes puntos de corte para el diagnóstico de obesidad central en esta población, en donde los más empleados corresponden a los percentiles 90 y 98.^{71,72}

<i>País/Grupo Étnico</i>	<i>Perímetro de cintura (cm) (Parámetro de obesidad central)</i>	
	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>
Europeos	≥ 94	≥ 80
Chinos	≥ 90	≥ 80
Asiáticos del Sur	≥ 90	≥ 80
Japoneses*	≥ 90	≥ 80
Estados Unidos**	≥ 102	≥ 88
Sur América/ Centro América	Emplear recomendaciones para Asia	

Tabla 3. Perímetros de cintura en los diferentes países/grupos étnicos

2.4 Citocinas

2.4.1 INTERLEUCINA-6

Producida por múltiples células (monocitos/macrófagos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, fibroblastos y células de diferentes tejidos como hígado, SNC, endotelio y páncreas) y junto con la IL-1 y el TNF- α , constituye el grupo más importante de citocinas proinflamatorias, y con mayor actividad pleiotrópica y de redundancia funcional.⁷³ La producción de la IL-6 es estimulada principalmente por el TNF- α y las catecolaminas, y es inhibida por los glucocorticoides, mientras que la insulina no modifica su producción.⁷⁴ Circula de forma glucosilada, en tamaños que oscilan entre los 22 y 27 kDa, y de su receptor, homólogo al receptor de Lp, existe una forma transmembranal y otra soluble. La señalización de IL-6

comienza por medio de un complejo conformado por el receptor y por dos moléculas homodimerizadas de IL-6, un tercio de la cual se expresa en los adipocitos y en la matriz del TA. Su expresión y secreción son de dos a tres veces más en el TAV que en el TAS, circula en altos niveles sanguíneos y su expresión y niveles circulantes se correlacionan positivamente con obesidad, intolerancia a la glucosa e insulinoresistencia.⁷⁵

En el TA los adipocitos y los MFGs secretan IL-6¹⁰ y su producción aumenta con el incremento de la adiposidad, a la vez que las concentraciones circulantes de IL-6 correlacionan altamente con el porcentaje de grasa corporal⁷⁶ y con la RI,⁷⁷ ya que disminuye la señalización de insulina en tejidos periféricos, inhibe la adipogénesis y estimula la lipólisis, aumentando la circulación de AGL y disminuye la secreción de adiponectina.⁷⁸ Existe una fuerte interacción entre la IL-6 y las rutas de señalización de la insulina, la cual tiende a dañar el efecto biológico de ésta, y aunque el mecanismo exacto aún no está claro, éste podría involucrar la reducción de la expresión de los componentes de señalización del receptor de insulina, la activación de la enzima tirosina fosfatasa o la inducción del supresor 3 de señalización de citocinas (SOCS3) (regulador negativo de la señalización de Lp e insulina), que interfiere con la señal de traducción de la citocina y con la fosforilación de tirosina del receptor de insulina y del sustrato del receptor de insulina 1 (por sus siglas en inglés (IRS-1)), generando la degradación proteosómica del IRS-1, lo que reduce la activación de la Proteína Kinasa B (PKB) que normalmente causa la translocación del Transportador de Glucosa 4 (GLUT-4) a la membrana plasmática.^{79,80} Debido a que en el sistema nervioso central los efectos de la IL-6 son diferentes y sus niveles se correlacionan negativamente con la masa grasa en los pacientes con sobrepeso, se sugiere una deficiencia central en la obesidad.⁷⁸ La IL-6 constituye una citocina que actúa sobre muchas células y tejidos y uno de sus principales efectos es la

inducción de la producción hepática de la Proteína C Reactiva (por sus siglas en ingles CRP)), la cual se conoce que es un marcador independiente de complicaciones cardiovasculares. Existe una fuerte relación entre el contenido de IL-6 en el TA y los niveles circulantes tanto de IL-6 como de CRP, por lo que se ha planteado la hipótesis de que el TA juega un papel importante en la regulación de la concentración sérica de la CRP debido a la producción de la IL-6.⁸¹ Bastard⁸² encontró una fuerte correlación entre las concentraciones séricas de CRP y el contenido de IL-6 en el TA, encontrando una fuerte correlación cuando se expresó en picogramos por el total de masa grasa. Esos datos son consistentes con el rol del TA humano en la regulación de las concentraciones sanguíneas de CRP debido a la producción de IL-6 durante la obesidad. La IL-6 puede incrementar el riesgo aterogénico debido a su participación en tres fases del proceso aterosclerótico; a) Induce la activación de células endoteliales, ya que constituye el mayor regulador de la respuesta de fase aguda hepática, lo que conlleva a un aumento en los valores de CRP y de fibrinógeno, entre otros, b) Conecta a la obesidad con un estado inflamatorio de baja intensidad, c) Promueve la coagulación sin afectar la fibrinólisis, por lo que favorece un estado procoagulante.⁸³

Pero también se ha demostrado que la infusión de IL-6 humana recombinante (rh) en seres humanos sanos aumenta la lipólisis de todo el cuerpo y la oxidación de ácidos grasos libres (AGL).^{84,85}

Además, Wallenius⁸⁶ demostró recientemente que un ratón knockout (Noqueado) en IL-6 se convirtió en obeso, un fenotipo que se redujo parcialmente con tratamiento con IL-6. Por lo tanto, se ha sugerido que la IL-6 es una posible terapia de destino para los trastornos relacionados con la obesidad.⁸⁶ En línea con el metabolismo alterado de los ácidos grasos, el efecto de la IL-6 sobre la sensibilidad a la insulina no está completamente claro, ya que en

algunos estudios tanto in vitro como en in vivo, se ha demostrado que la IL-6 disminuye,^{87,88} aumenta,^{86, 89, 90} o no tiene ningún efecto⁹¹ sobre la sensibilidad a la insulina.

2.4.2 Adiponectina

La adiponectina (también conocida como Acrp30, AdipoQ, y GBP28), es una proteína de 244 residuos que, se produce únicamente por el TA. La adiponectina es una hormona derivada de los adipocitos que desempeña un papel fundamental en la regulación del metabolismo de lípidos y la glucosa.^{92,93} Fisiológicamente, la adiponectina estimula la oxidación de ácidos grasos y mejora la sensibilidad a la insulina de los órganos periféricos, lo que lleva al aumento de la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en los músculos.^{94,95} También ejerce funciones de protección contra inflamación crónica y la aterosclerosis.⁹⁶⁻⁹⁷ Además, varias líneas de evidencia indican que la concentración plasmática de adiponectina se ve seriamente disminuida en pacientes con obesidad,⁹⁸ la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.^{99,100} Teniendo en cuenta el importante papel de la adiponectina en el metabolismo energético, los agentes que estimulan la expresión de adiponectina pueden aportar beneficios contra la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y otras enfermedades metabólicas relacionadas.

Aunque la adiponectina fue descubierta casi al mismo tiempo que la Lp, su papel en la protección contra la obesidad y trastornos relacionados con la obesidad sólo comenzó a ser reconocido algunos años más tarde. Ahora se sabe que, además, tiene una amplia gama de efectos en patologías con componentes inflamatorios, como la enfermedad cardiovascular, la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico y la artritis reumatoide. Una evidencia de la relación que existe entre la adiponectina y la inflamación es el hallazgo de que su secreción se inhibe

por citocinas pro-inflamatorias tales como IL-6¹⁰¹ y TNF¹⁰² en los adipocitos en cultivo. Más recientemente, una explicación de cómo la hipoadiponectinemia podría contribuir al desarrollo de enfermedades relacionadas con la inflamación ha surgido por el hallazgo de que la adiponectina promueve la fagocitosis de las células apoptóticas (mediante la interacción con calreticulina en la superficie de los fagocitos), evitando así la acumulación de restos apoptóticos que puede provocar la inflamación y la disfunción del sistema inmune.¹⁰³

2.5 Plantas medicinales

En México el uso de plantas medicinales tiene un gran precedente histórico. Existen reportes que indican que países desarrollados, como en los Estados Unidos, el 20% de los sujetos diabéticos emplean la medicina herbolaria. Y en México una de las plantas más empleadas por los pacientes con DT2 (73.1% de ellos) es el nopal *Opuntia streptacantha*.¹⁰⁴ Además, en investigaciones etnobotánicas se reporta la existencia de más de 300 plantas usadas en México como antidiabéticas.^{105,106} Entre las familias botánicas más estudiadas científicamente en relación con su efecto hipoglucémico se encuentran: Cucurbitaceae y Asteraceae. Pertenecientes a estas familias se encuentran: *Cucurbita ficifolia* (***C. ficifolia***) (Figura 2).

2.5.1 *Cucurbita ficifolia* Bouché



Figura 2. Fruto maduro de ***C. ficifolia***

Familia: Cucurbitaceae

Nombre científico: ***Cucurbita ficifolia Bouché***

Nombre común: Calabaza de hoja de higo (Estados Unidos), calabaza del malabar, sidra (Náhuatl), chilacayote (México y Guatemala), lacayote (Perú, Bolivia y Argentina), chiverri (Honduras y Costa Rica), victoria (Colombia).

2.5.2 Descripción botánica

Planta perenne, resistente a las temperaturas extremas, excepto a la nieve. Ligeramente pubescente. Tiene cinco tallos angulares y hojas pecioladas. Con o sin manchas blancas en la superficie verde. Las flores masculinas son largas con un cáliz en forma de campana de 5-10 mm de largo y aproximadamente 5-15 mm de ancho, sépalos lineales y corola tubular en forma de campana, la cual es más ancha en la base de 6-12 cm. Las flores femeninas tienen pedúnculos fuertes de 3-5 cm de largo, su forma va de ovoide a elíptica, sépalos ocasionalmente foliáceos y una corola poco más grande que las flores masculinas. Fruta globosa, cuya forma va de ovoide a elíptica, el color va de verde claro a verde oscuro, con o sin líneas blancas longitudinales o rayas hacia el ápice, el endocarpio es dulce y las semillas son ovaladas de 7-12 mm de color castaño oscuro a negro.

2.5.3 Distribución geográfica

Estado de México, Puebla y Chiapas.

2.5.4 Componentes químicos

Andrade-Cetto y Heinrich¹⁰⁶ reportan que *C. ficifolia* posee principalmente los siguientes compuestos: lecitinas en tallos y raíces. El 1.2% de la parte comestible es proteína, 1.7 mg calcio, 0.6 mg de hierro, 7 mg de ácido ascórbico y 0.03 mg de tiamina. Xia y Wang,¹⁰⁷ demostraron que en el extracto acuoso de *C. ficifolia* se encuentra presente el compuesto D-qui-ro-inositol (DQI) (Figura 3), mediador de los efectos de la insulina. Previamente también identificaron catequina, L-ácido ascórbico, ácido p-cumárico, ácido gálico y nicotinamida como compuestos antioxidantes en el extracto.¹⁰⁸

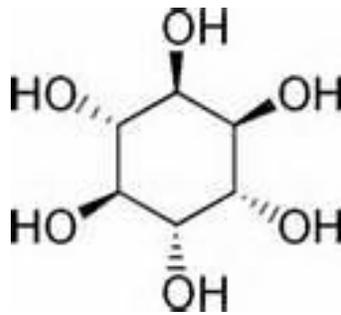


Figura 3. D-qui-ro inositol

2.5.5 Uso medicinal

Se emplea comúnmente en los platillos de la cocina mexicana, o como dulce. Tanto la infusión de las semillas como el fruto se emplean para el control de la diabetes.

3. Planteamiento del problema

Considerando que:

1) La Organización Mundial de la Salud define a la obesidad como una excesiva y anormal acumulación de grasa corporal, además de ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de una variedad de enfermedades crónico-degenerativas, incluyendo enfermedades cardiovasculares (ECV), la diabetes tipo 2 y ciertos tipos de cáncer.⁶ En México, la prevalencia combinada de sobrepeso-obesidad (69.4 y 73% en hombres y mujeres respectivamente) son un factor de riesgo común para las principales causas de muerte.¹⁰⁹

2) La demanda por nuevos tratamientos para evitar las complicaciones relacionadas con la obesidad se incrementa día a día.

3) En la obesidad y en DT2 se presenta un proceso inflamatorio persistente de baja intensidad.

Estudios fitoquímicos recientes, realizados en el laboratorio de Farmacología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), han mostrado que los extractos hipoglucemiantes de esta planta (***C. ficifolia***) contienen alcaloides, saponinas, ácidos grasos, carbohidratos y esteroides, los cuales han sido asociados con actividades antioxidantes. Debido a que en previos estudios se ha mostrado la utilidad de los antioxidantes en la prevención y control de la DT2 es importante estudiar el papel que desempeña la IL-6, así como sobre la adipocina antiinflamatoria adiponectina en modelos en vitro de la línea celular 3T3-L1, ya que se sabe que dichos marcadores se modifican en la DT2.

La presente investigación representa el comienzo para esclarecer cuáles son los efectos de ***C. ficifolia*** sobre la inflamación y sobre la diferenciación de los adipocitos, sentando las bases para nuevas investigaciones clínicas que permitan el desarrollo de fitofármacos o

medicamentos para el control de la obesidad y la DT2. Además, esta investigación sería una contribución al conocimiento de alternativas validadas experimentalmente en el control de la obesidad y de sus complicaciones lo cual, a su vez, podría incentivar mejoras en el cultivo, y preservación de dicha especie.

4. HIPOTESIS

Si se somete a tratamiento la línea celular 3T3-L1 durante su diferenciación con el extracto de ***C. ficifolia***, entonces este modificara la expresión del ARNm de IL-6 y adiponectina, como la acumulación de lípidos en los adipocitos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los cambios en la expresión del ARNm y de la proteína de IL-6, durante el proceso de diferenciación en los adipocitos en cultivo, en ausencia y en presencia del extracto estandarizado de ***C. ficifolia*** a diferentes concentraciones, con base en su contenido en DQI (0.05 mM, 0.125 mM, 0.25 mM).

5.2 Objetivos particulares

En las células 3T3-L1 durante la diferenciación, con y sin el tratamiento con ***C. ficifolia*** se determinará lo siguiente en la línea celular:

- 1) La expresión de ARNm de IL-6.
- 2) La concentración de proteína IL-6 liberada al medio de cultivo.
- 3) La expresión de los ARNm de PPAR γ y de adiponectina.
- 4) Y el contenido de lípidos totales en los adipocitos por medio de rojo oleoso en un lector de ELISA.

6. Material y métodos

Equipo e instrumentos

Incubadora de CO ₂ . (Thermo Fisher Scientific HERAcell 150 i).	HPLC. (Waters 2695)
Campana de flujo laminar. (NUAIRE LabGard 629).	Lector de ELISA. (MULTISKAN FC de Thermo Scientific)
Centrifuga (Beckman).	Ultracongelador -80 °C. (So-Low).
Espectrofotómetro. (epoch BioTek).	Vortex. (Daigger Vortex Genie 2).
Balanza semianalítica. (Sartorius BP 21005).	Laptop (VAIO Windows 7).
Microscopio invertido. (CK40 Olympus).	LightCycler 2.0. (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany).
Micropipetas (Finnpipette)	Centrifuga. (Thermo Fisher Scientific)

Material

Marcadores Sharpie.	Tubos cónicos de 15 mL y 50 mL.
Puntas para micropipetas.	Probeta de 100 mL
Jeringas de 1 mL.	Guantes de nitrilo.
Espátulas.	Papel absorbente.
Gradillas.	Cajas para refrigerar y congelar muestras.
Pisetas.	Recipientes para desechos.
Tubos eppendorf de 0.5 mL y 1.5mL	Matraz Erlenmeyer de 100 mL.
Botellas para cultivo celular (Corning)	Placas de 6 pozos para cultivo celular (Corning)

Material biológico y reactivos

Línea celular 3T3-L1 (ATCC)	MEMD (ATCC)
Agua mili-Q	Suero de ternera (Cellgro)
Etanol (Merck)	Suero fetal bovino (Cellgro)
Isopropanol (Sigma)	Insulina (Sigma)
Tripure (Roche)	Metil isobutil xantina (Sigma)
Cloroformo (Sigma)	Dexametasona (Sigma)
Agarosa LE (Nara Biotec)	Gentamicina (Gibco)
Piruvato (Gibco)	Glutamina (Invitro)
Aminoácidos no esenciales	Estuche para cDNA ImProm II (Promega)
Estuche para ELISA (RayBiotech Mouse IL-6)	Estuche para PCR (LightCycler FastStar DNA Master SYBR Green I)
Iniciadores para IL-6, adiponectina y PPAR γ (Invitrogen)	PBS (Sigma)
Rojo oleoso (Sigma)	Formalina (Sigma)
Hipoclorito de sodio al 5%	EDTA (Sigma-Aldrich)

➤ Tipo de estudio

Estudio experimental, prolectivo, longitudinal, comparativo

➤ Población de estudio

Células embrionarias de ratón suizo, línea 3T3-L1 de fibroblastos

➤ Criterios de inclusión

Células que generalmente sean del pase 1 al 7 y que se diferencien a adipocitos

➤ Criterios de exclusión

Células que no tengan la capacidad de adherencia, estén contaminadas o su crecimiento sea muy lento.

➤ Criterios de eliminación

Células que pierdan la capacidad de adherencia, se contaminen o no se diferencien a adipocitos.

➤ Variables

- Dependientes: cantidad de lípidos presentes en los adipocitos, expresión del ARNm de PPAR γ , adiponectina e IL-6 y la proteína IL-6 liberada por los adipocitos al medio de cultivo.

- Independientes: concentraciones del extracto de ***C. ficifolia*** con base en su contenido en D-qui-ro-inositol (0.05 mM, 0.125 mM, 0.25 mM), tiempo, temperatura y número de células.

➤ Análisis estadístico

ANOVA de un factor

6.1 Metodología

6.2 Obtención del extracto:

El fruto de ***C. ficifolia*** fue colectado en Acolman, Estado de México (Herbario IMSS-M, Num. de registro 11,119). Para la preparación del extracto, el fruto se dejó sin cáscara, libre de bagazo y semillas; fue cortado en rebanadas delgadas y se dejó en aireación constante para su deshidratación. El material seco fue triturado en un molino eléctrico (Wiley) usando una rejilla de 1 mm de diámetro. Este material (400 g) fue sometido a maceración con agua (4 L) durante 72 h dentro de una campana de flujo laminar; cada 24 h se recuperó la fase acuosa, la cual fue liofilizada. El producto fue disuelto en medio de cultivo y filtrado (filtro de 0.22 µm) para aplicar los tratamientos a las células.

6.3 Estandarización del extracto de *Cucúrbita ficifolia*

Existe suficiente evidencia experimental y clínica que demuestran el efecto hipoglucémico de ***C. ficifolia*** y también se ha encontrado que la parte comestible contiene principalmente: fibra, proteínas, calcio, hierro, ácido ascórbico, tiamina¹⁰⁶ y D-qui-ro inositol.¹⁰⁷ Este último

compuesto es un mediador de los efectos de la insulina, es uno de los más abundantes en el extracto acuoso, y se utilizó para estandarizar el extracto en nuestros experimentos.

Para demostrar la presencia de DQI y su cuantificación, se realizó un análisis por HPLC, empleando un sistema cromatográfico provisto de un módulo de separación Waters 2695 y un detector de índice de refracción (Waters; Milford, MA, USA). Se empleó una columna Lichrospher NH₂ 5 µm 250x4 mm, 100 Å. El sistema de elusión fue CH₃CN/H₂O 80:20, con un flujo de 1 mL/min, durante 10 min. Tres concentraciones ascendentes del estándar de DQI (1.5, 3, y 6 mg/mL, en 20 µL) fueron inyectados por duplicado bajo las mismas condiciones del sistema Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (por sus siglas en inglés (HPLC)). El DQI mostró un tiempo de retención de 8.6 min, presentando un coeficiente de correlación de 0.93. En el sistema se inyectaron 2 mg de extracto de ***C. ficifolia*** en un volumen de 20 µL que corresponde a 3.7 mg de DQI/g de extracto.

6.4 Cultivo celular

3T3-L1 fibroblastos murinos fueron cultivados en el Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (MEMD, Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.) suplementado con glucosa 25 mM, piruvato 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,01 mM, gentamicina 20 µg/ml y suero de ternera (ST) al 10 %, a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada dos días hasta alcanzar la confluencia. A los dos días postconfluencia (día cero), los fibroblastos se diferenciaron en adipocitos con metil isobutil xantina (500 µM), dexametasona (0.5 µM) e insulina (1.2 µM) en MEMD más 10 % de SFB. Dos días más tarde, el medio se

reemplazó con solamente 1.2 μ M de insulina durante dos días más. Los adipocitos se sometieron a diferentes tratamientos (0.05 mM, 0.125 mM y 0.25 mM con base a su contenido en DQI) con el extracto de *C. ficifolia* cada dos días durante los ocho días de diferenciación en MEMD suplementado con SFB al 10 %, en donde estas fueron recuperadas cada dos días con el reactivo de tripure para su posterior extracción de RNA.

6.5 Tinción de lípidos con rojo oleoso

Las células se fijaron con formalina al 10 %, después se lavaron con isopropanol al 60%. La tinción con rojo oleoso (0.36 % en isopropanol 60 %) se llevó a cabo durante 20 min., después la células se lavaron con agua PBS estéril para retirar el exceso del colorante. El colorante se recuperó con 1 mL de isopropanol absoluto, y se determinó la absorbancia a 492 nm en el lector de ELISA (MULTISKAN FC de Thermo Scientific).

6.6 Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total, las células se cultivaron en placas de 6 pozos y se utilizó el método descrito por el proveedor del reactivo Tripure (Roche, Indianápolis, USA método descrito por Chomczynski y Sacchi, 1987).¹¹⁰ El procedimiento se realizó en una campana, se adiciono 1 mL de reactivo directamente al cultivo, se hizo pasar varias veces por una aguja con jeringa de 1 mL (para lisar las células) y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se incubó por unos minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se realizó una centrifugación a 1400 rpm durante 10 min. a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se le adiciono cloroformo, agitando manualmente por un minuto, se dejó en reposo por unos minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugo por 15 min., a la fase acuosa se le agrego

isopropanol (para precipitar el ARN), se mezcló y se incubó en hielo. Enseguida se llevó a cabo otra centrifugación por 10 min. a 4 °C, el sobrenadante se eliminó (fase superior) y al precipitado se le adicionó etanol al 75 %, se agitó en el vortex, después se centrifugó por 5 min. a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y se lavó dos veces con etanol al 75 % y se centrifugó por 5 min. a 4 °C. El precipitado se secó en la campana y se resuspendió en agua libre de ARNsas.

6.7 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se realizó la transcripción en reversa para sintetizar DNA complementario a partir de ARN, mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa, con el uso del estuche de ImProm II (Promega, Madison, USA). Se utilizaron 2 µg de ARN total; se adicionó una mezcla de iniciadores al azar (random primers 0.5 µg/µL), que están formados por seis nucleótidos, estos se unen aleatoriamente al ARN para su retrotranscripción.

6.8 PCR en Tiempo Real

La amplificación del cDNA se llevó a cabo con la enzima DNA polimerasa usando un estuche de “LightCycler FastStar DNA Master SYBR Green I” para las adipocinas IL-6 y adiponectina, así como también para el gen de normalización (proteína ribosomal 36B4). Este proceso se realizó empleando el equipo LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany), que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo. Se preparó una mezcla de reacción con el cDNA de las adipocinas descritas previamente o de 36B4, los iniciadores hacia delante y reverso correspondientes, más la enzima FastStart, amortiguador para PCR, SYBER Green y MgCl₂.

6.9 Determinación de la proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo mediante el método de ELISA en sándwich

Los preadipocitos fueron tratados durante su diferenciación (2, 4, 6 y 8 días) con diferentes concentraciones (0.05 mM, 0.125 mM y 0.25 mM) del extracto acuoso de ***C. ficifolia***, en donde el control fueron las células sin tratamiento. Después de los periodos de incubación, el medio de cultivo fue recuperado y los niveles de la proteína fueron medidos usando el kit del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para IL-6 (RayBiotech Mouse IL-6 ELISA Kit, Parkway Lane, USA).

7. Resultados

7.1 Expresión del ARNm de PPAR γ en células 3T3-L1

En la Figura 4, se puede observar en la gráfica que la expresión del ARNm de PPAR γ en la línea celular 3T3-L1 durante la diferenciación de fibroblastos (día 0) a adipocitos, no presenta un cambio significativo entre los días dos al seis y el día diez con respecto al control (día 0), mientras que en el día ocho se incrementa significativamente, con una $p < 0.05$.

En la Figura 5 se observa que los productos de PCR en tiempo real presentaron un tamaño de 217 pb, que corresponde al esperado para PPAR γ .

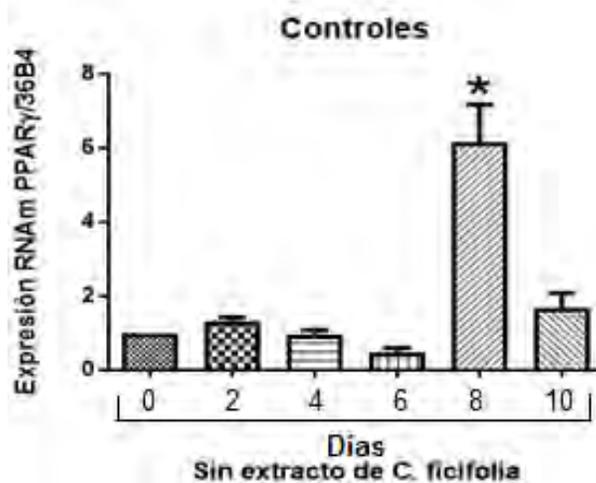


Figura 4. Gráfica que muestra la expresión del ARNm de PPAR Gamma a los diferentes tiempos (2, 4, 6, 8 y 10 días) durante la diferenciación. El * indica una $P < 0.05$.

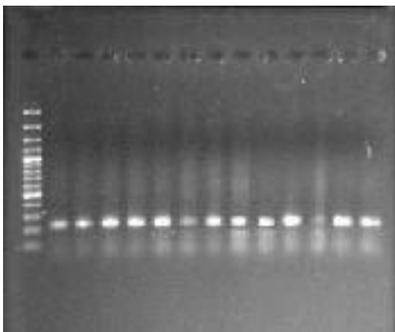


Figura 5. Productos de la expresión del ARNm de PPAR γ . En la imagen se observan los resultados de expresión por PCR en tiempo real de algunas muestras representativas de diferentes experimentos, las cuales se analizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa. Primer carril estándar DNA ladder de 100pb. Productos con 217 pares de bases.

La expresión del ARNm de PPAR γ se modifica durante la diferenciación de fibroblastos a adipocitos en la línea celular 3T3-L1 después de ser tratados con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *C. ficifolia* (con base en su contenido de DQI), se puede observar que en las gráficas de la Figura 6 la expresión de PPAR γ se incrementó significativamente ($p < 0.05$) con respecto a su control en los días dos y seis de diferenciación en las células tratadas con el extracto (0.05 y 0.125 mM), y en los días cuatro y ocho se incrementó solamente con 0.05 y 0.125 mM, respectivamente, en cambio disminuyó en el día dos con la concentración más alta (0.25 mM).

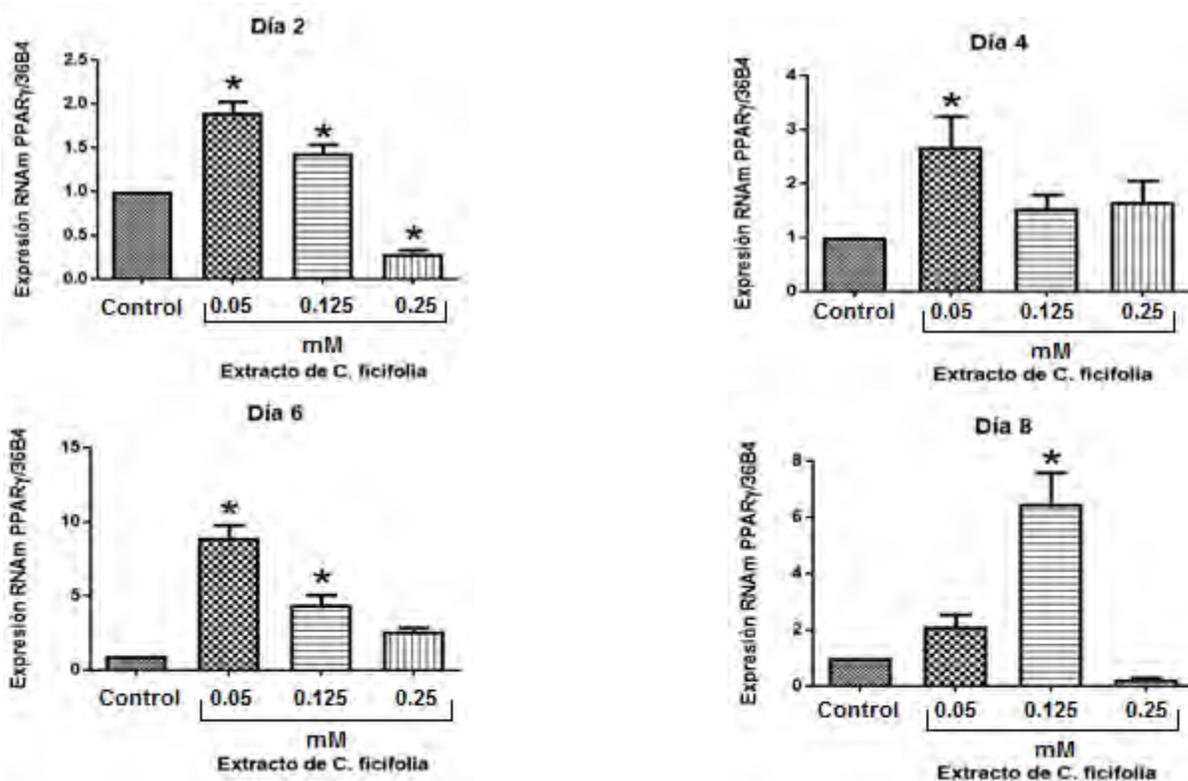


Figura 6. Expresión del ARNm de PPAR γ en células 3T3-L1. En las gráficas se muestra el número de veces que se expresa el ARNm de PPAR γ durante la diferenciación a adipocitos (días 2, 4, 6 y 8) y después del tratamiento con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *C. ficifolia* (en base al contenido de DQI 0.05, 0.125 y 0.25 mM). Se usó como gen de referencia el de la proteína ribosomal 36B4. El * indica una $P < 0.05$ cuando se comparan los tratamientos contra su control.

7.2 Resultados de la expresión del ARNm de adiponectina

En la gráfica de la Figura 7 se puede observar la expresión del ARNm de adiponectina durante la diferenciación en la línea celular 3T3-L1, en donde los fibroblastos (0 a 2 días) y los preadipocitos (día 4 de diferenciación) no presentan expresión del ARNm de adiponectina, mientras en los días 6, 8, y 10 se incrementa significativamente su expresión con respecto al control del día 0, con una $p < 0.05$. En la Figura 8 se presentan los productos de PCR tiempo real, usando los iniciadores correspondientes a adiponectina.

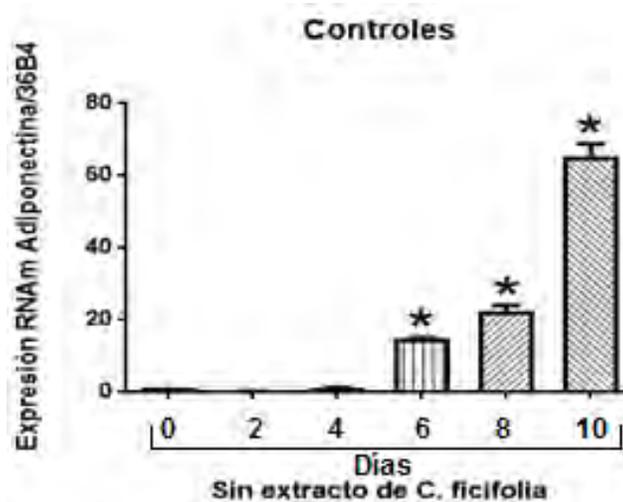


Figura 7. Se muestra la expresión del ARNm de adiponectina a los diferentes tiempos (2, 4, 6, 8 y 10 días) durante la diferenciación en la línea celular 3T3-L1. El * indica una $P < 0.05$.

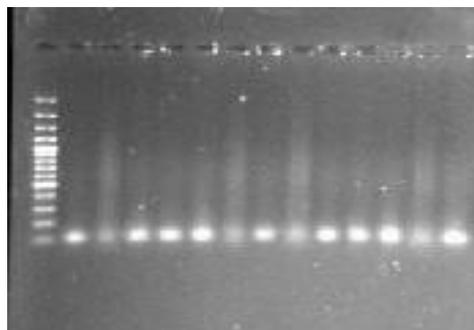


Figura 8. electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de PCR tiempo real del ARNm de adiponectina.

En las gráficas de la Figura 9 se presentan los resultados de la expresión del ARNm de Adiponectina después del tratamiento con el extracto acuoso de *C. ficifolia*, se observa que en el día 2 de diferenciación se ve disminuida la expresión de adiponectina con respecto a su control con cualquiera de las concentraciones usadas, con una $p < 0.05$. Mientras que a los días 4 y 6 de diferenciación, las concentraciones del extracto 0.05 y 0.125 mM fueron las que más incrementaron la expresión de dicha adipocina. En cuanto a la gráfica del día 8 se puede apreciar que con las concentraciones de 0.05 y 0.125 mM de *C. ficifolia* incrementó la expresión del ARNm de adiponectina, mientras que se disminuyó solamente con la concentración más alta (0.25 mM).

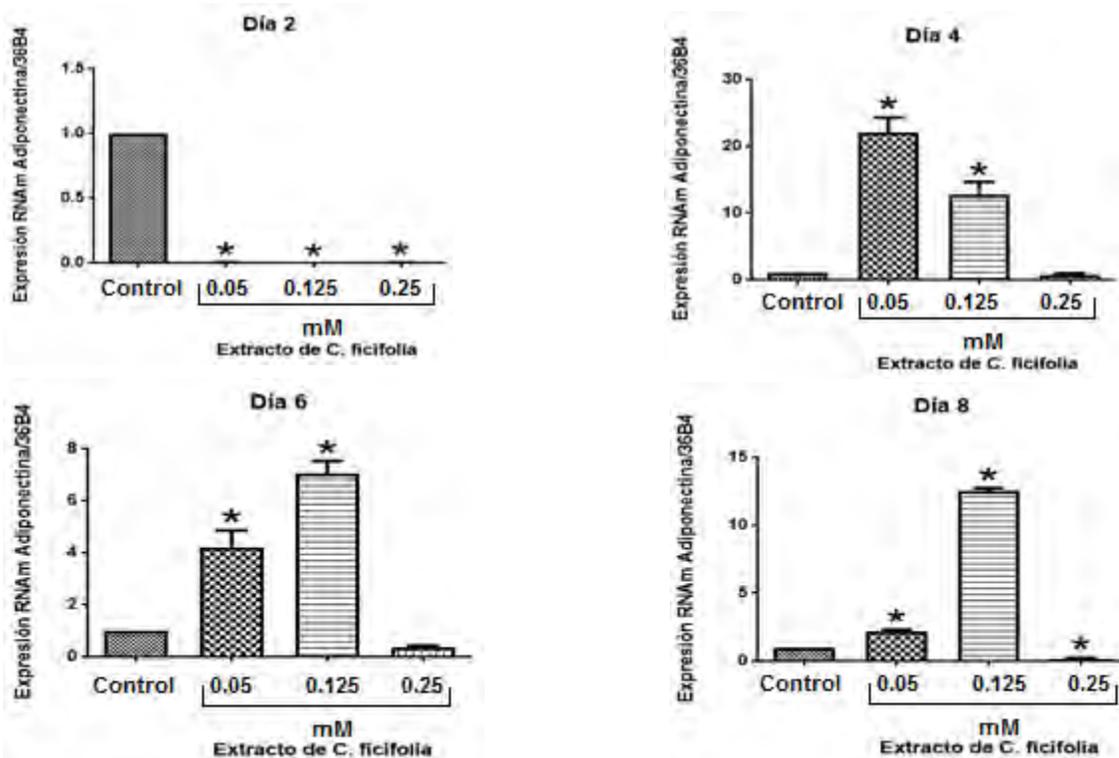


Figura 9. Expresión del ARNm de adiponectina en células 3T3-L1 tratadas con *C. ficifolia*. Gráficas que muestran el número de veces que se expresa el ARNm de Adiponectina a diferentes concentraciones con el extracto acuoso de *C.ficifolia* (con base al contenido de DQI 0.05, 0.125 y 0.25 mM). Se usó como gen de referencia el de la proteína ribosomal 36B4. El * indica una $P < 0.05$.

7.3 Expresión del ARNm de IL-6

Como se puede observar en la gráfica de la Figura 10 de la expresión del ARNm de IL-6 durante la diferenciación en la línea celular 3T3-L1, no cambia en los días 2, 4, 8 y 10. Solo en el día 6 hay un aumento significativo con una $P < 0.05$. Figura 11 productos de PCR tiempo real

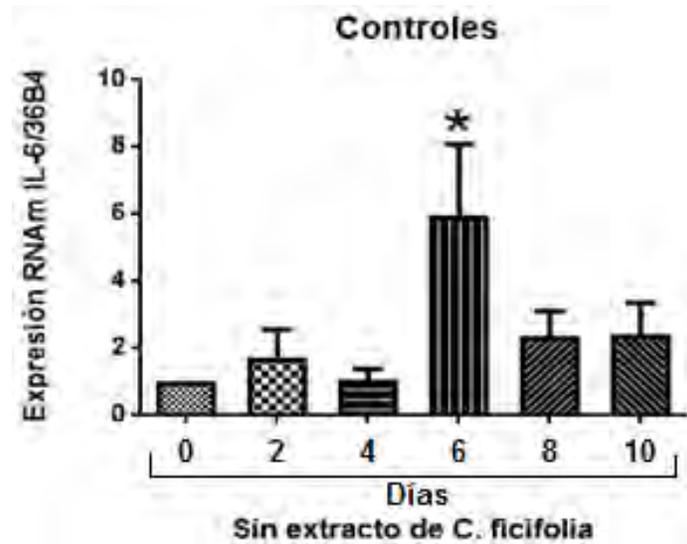


Figura 10. Gráfica que muestra la expresión del ARNm de IL-6 a los diferentes tiempos (2, 4, 6, 8 y 10 días) durante la diferenciación en la línea celular 3T3-L1. El * indica diferencia significativa con respecto al control (día 0).



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa que muestra el producto de PCR tiempo real de muestras representativas de varios experimentos, se usaron iniciadores para la expresión del ARNm IL-6, el tamaño de los productos fue de 126 pares de bases.

En las gráficas de la Figura 12 se observa la expresión del ARNm de IL-6 en las células 3T3-L1 al día dos de diferenciación y después del tratamiento con el extracto acuoso de *C. ficifolia* a diferentes concentraciones (0.05, 0.125 y 0.25 mM) con respecto a su propio control del día 2 sin tratamiento, la única que presentó un incremento en la expresión del ARNm de IL-6 fue la de 0.25 mM con una $p < 0.05$. Mientras que en las gráficas de los días 4 y 8 se observa que las concentraciones de 0.125 y 0.25 mM fueron las que más incrementaron dicha expresión. En cuanto a la gráfica del día 6 se puede apreciar que con las tres concentraciones se incrementó la expresión del ARNm de IL-6.

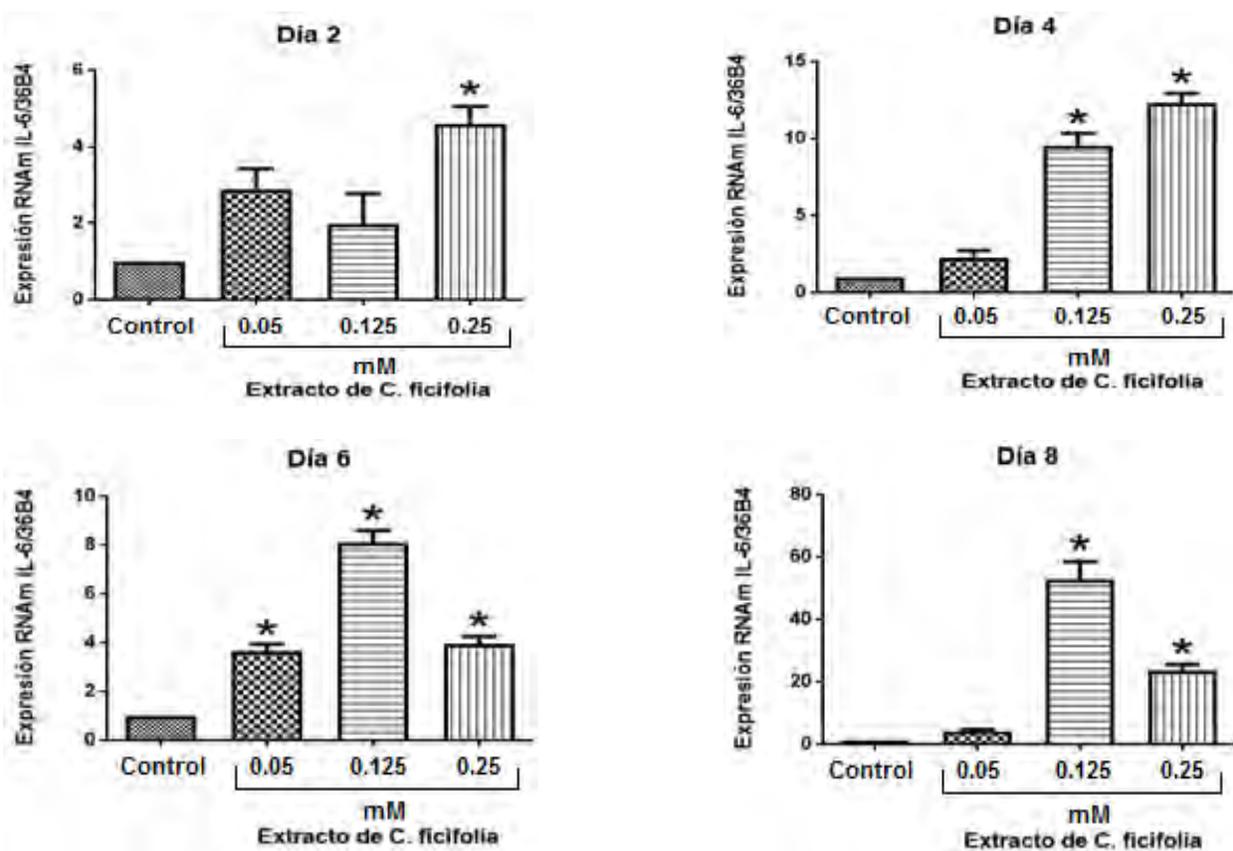


Figura 12. Expresión del ARNm de IL-6 en células 3T3L-1 tratadas con *C. ficifolia*. En las gráficas se muestra el número de veces que se expresa el ARNm de IL-6 durante su diferenciación a adipocitos y después del tratamiento con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *C. ficifolia* (con base al contenido de DQI 0.05, 0.125 y 0.25 mM). Se usó como gen de referencia el de la proteína ribosomal 36B4. El * indica una $P < 0.05$.

7.4 Proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo

En la gráfica de la Figura 13 se puede observar la proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo durante la diferenciación en la línea celular 3T3-L1. Se muestran los cambios en la liberación de IL-6 a los diferentes días de diferenciación con respecto al control (día 0). Se puede observar que no hay un cambio significativo en el día 2, mientras que a los días 4, 6 y 8 de diferenciación se observa disminución en IL-6 liberada con respecto al control. Por otra parte en el día 10 se puede observar un incremento de la proteína liberada al medio de cultivo con una $p < 0.05$.

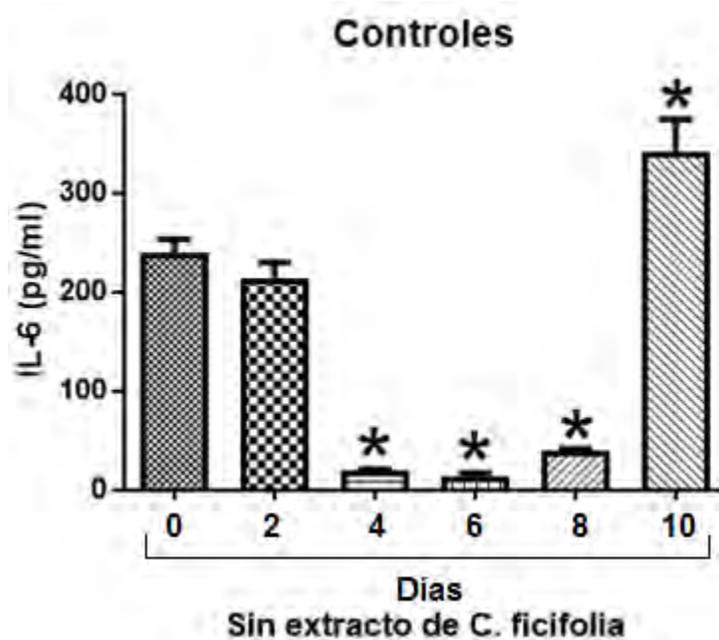


Figura 13. Gráfica que muestra la proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo a los diferentes tiempos (2, 4, 6, 8 y 10 días) durante la diferenciación. El * indica una $P < 0.05$.

En las siguientes gráficas (Figura 14) se observa que en las células 3T3-L1 tratadas con el extracto de *C. ficifolia* a los días 2, 4, 6 y 8 se incrementó la IL-6 liberada al medio de cultivo, sin embargo la única que no presentó una diferencia significativa fue la del día 4 con una concentración de 0.05 mM.

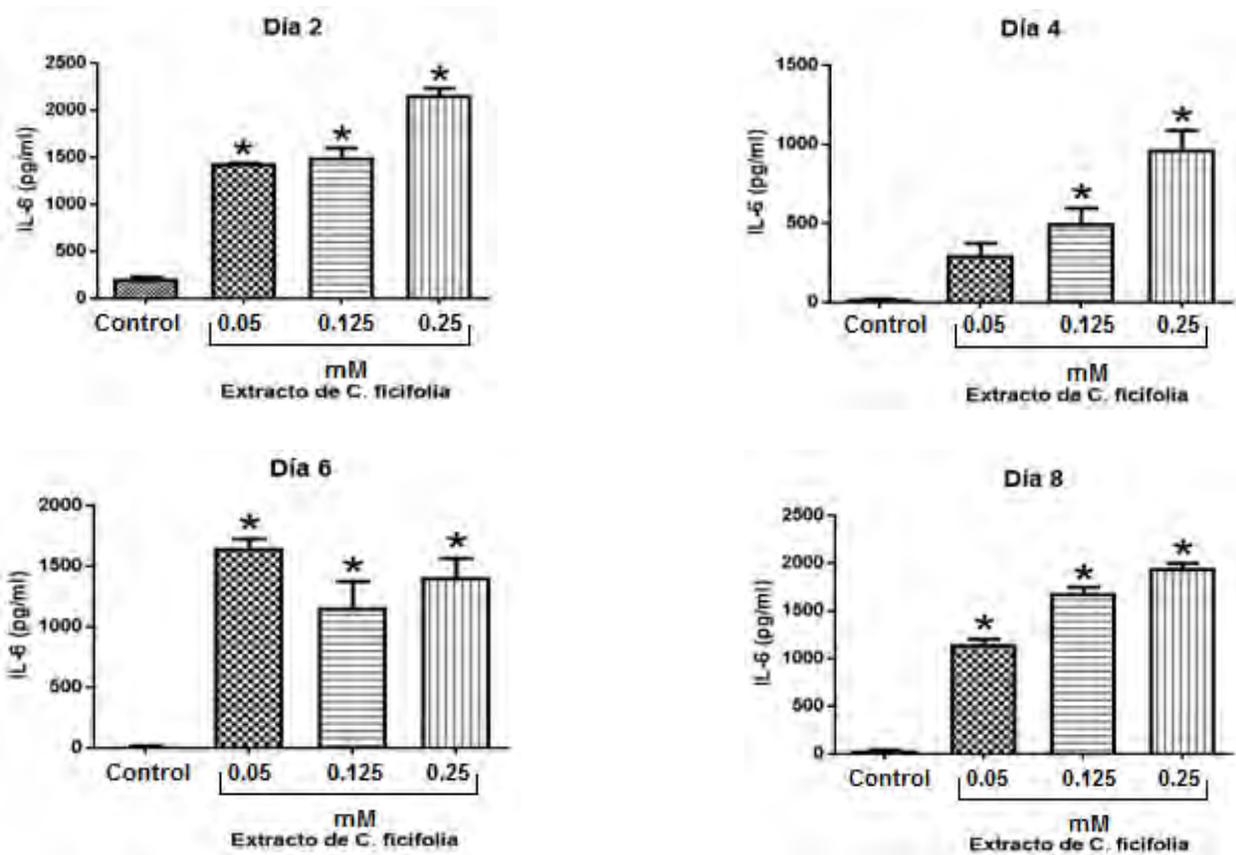


Figura 14. Gráficas que muestran la proteína de IL-6 liberada al medio cultivo después que las células 3T3-L1 fueron tratadas con diferentes concentraciones con el extracto acuoso de *C.ficifolia*. El * indica una significancia menor de 0.05.

7.5 Resultados de PPAR γ , adiponectina, IL-6 y la proteína de IL-6 liberada en adipocitos maduros tratados con el extracto acuoso de *C. ficifolia* durante 48 horas.

En los adipocitos maduros de la línea celular 3T3-L1 (día 8 de diferenciación) después del tratamiento por 48 horas (día 10) con las diferentes concentraciones de *C. ficifolia*, se puede observar en las siguientes gráficas (Figura 15), que la expresión del ARNm de PPAR γ y de adiponectina se incrementaron con las concentraciones de 0.05 mM y 0.125 mM, mientras que en la expresión del ARNm de IL-6 se incrementó con las concentraciones de 0.125 mM y 0.25 mM, efecto muy similar a la proteína IL-6 liberada al medio de cultivo donde se observó incremento con las tres concentraciones.

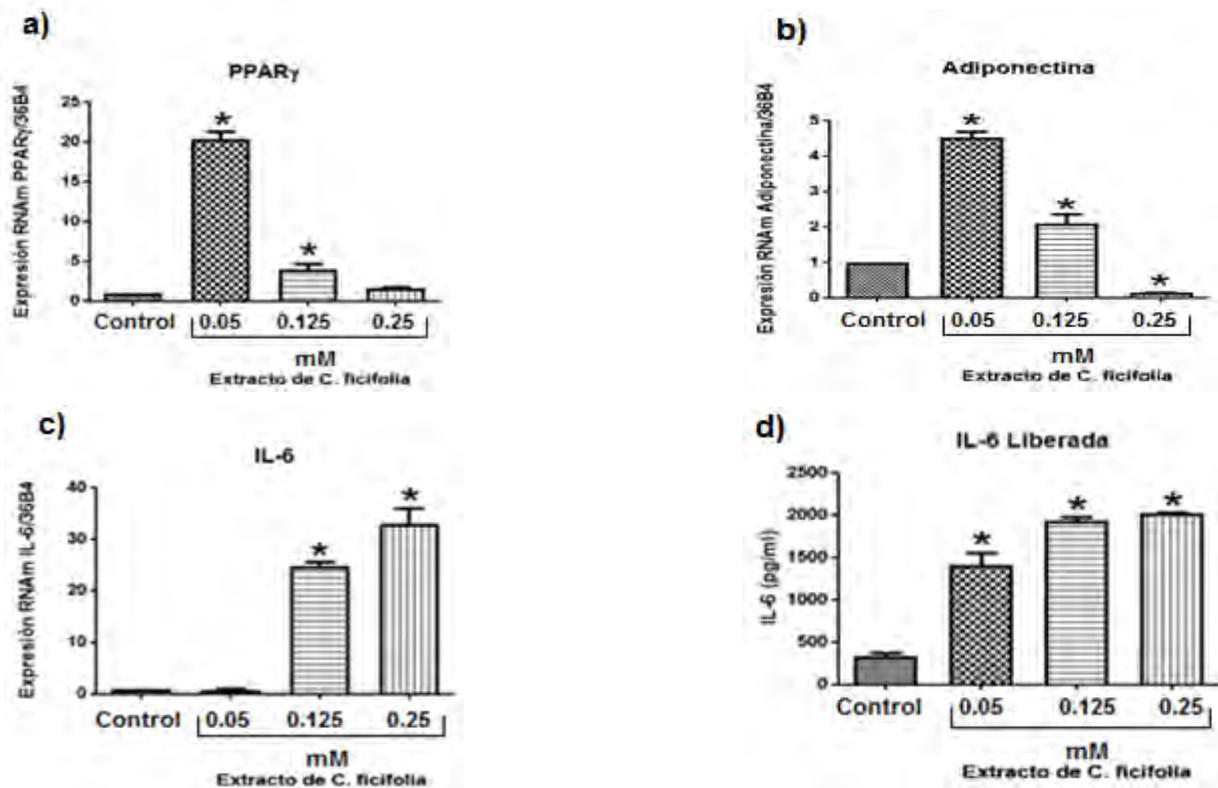
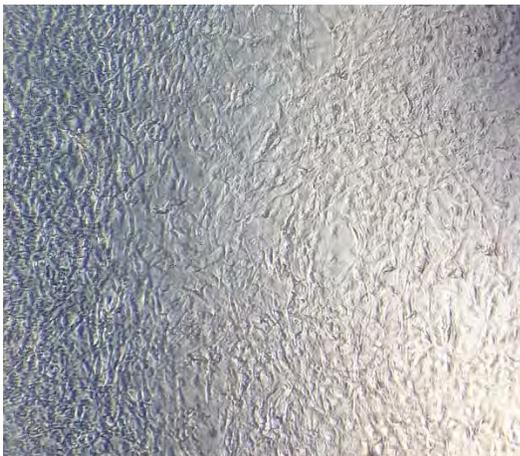


Figura 15. Adipocitos maduros (día 8) tratados por 48 horas con *C. ficifolia*. Gráficas que muestran la expresión del ARNm de PPAR γ (a), Adiponectina (b) e IL-6 (c) en adipocitos maduros tratados, como también la proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo (d), después del tratamiento por 48 horas con diferentes concentraciones (0.05mM, 0.125mM y 0.25mM) del extracto acuoso de *C. ficifolia*. El * indica una P < 0.05.

7.6 Resultados de lípidos

En la Figura 16 se observa la acumulación de lípidos en las células 3T3-L1 durante la diferenciación de fibroblastos a adipocitos. Los lípidos se tiñeron con rojo oleoso. Se determinó también la acumulación de lípidos totales mediante un lector de ELISA midiendo la absorbancia del colorante recuperado con isopropanol absoluto (Figura 17, pág. 58).



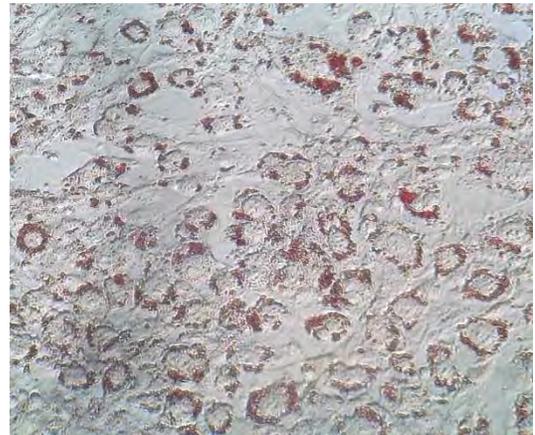
Día cero fibroblastos



Día dos preadipocitos



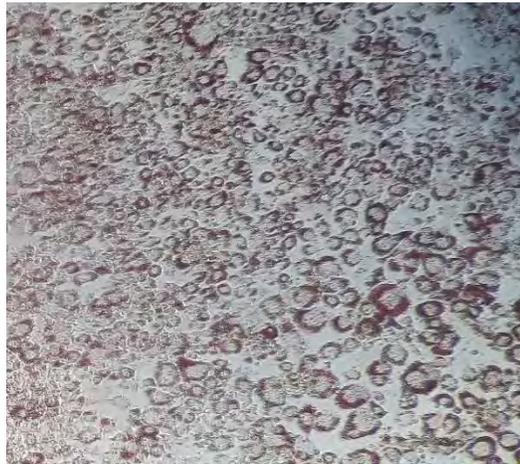
Día cuatro preadipocitos



Día seis adipocitos

Figura 16. Fotos a 20x en donde se observa la acumulación de lípidos en las células 3T3-L1 durante la diferenciación de fibroblastos a adipocitos. Los lípidos se tiñeron con rojo oleoso.

Continuación de la Figura 16



Día ocho adipocitos maduros

En la siguiente gráfica de la Figura 17, se puede observar que la acumulación más alta de lípidos totales, determinados por tinción con rojo oleoso, fue en los días 6 y día 8 en la diferenciación, de las células 3T3-L1 que no recibieron tratamiento con el extracto.

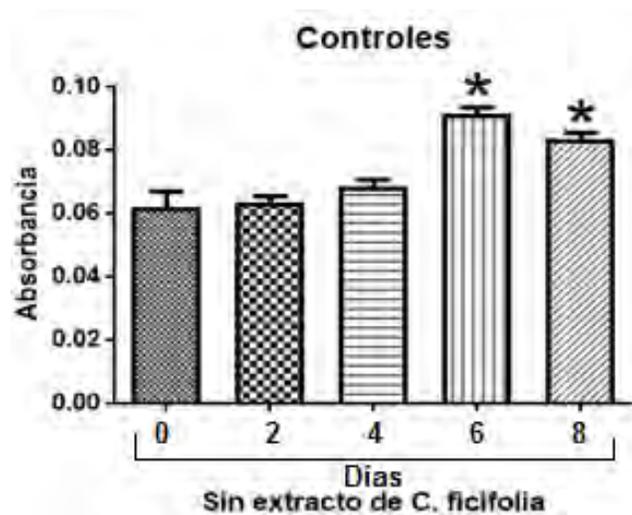
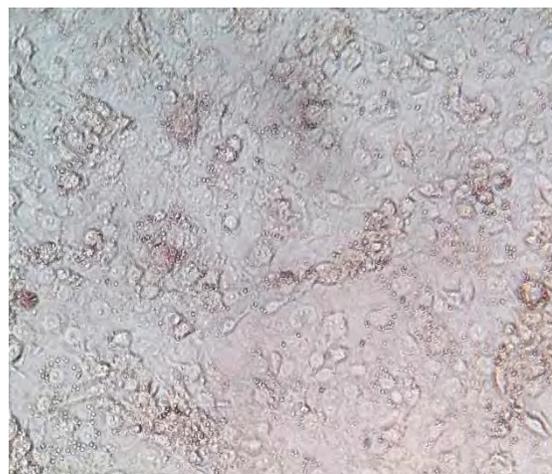


Figura 17. Gráfica que muestra la acumulación de lípidos (teñidos con rojo oleoso) a los diferentes tiempos (2, 4, 6 y 8 días) durante la diferenciación en la línea celular 3T3-L1. El * indica una significancia menor de 0.05.

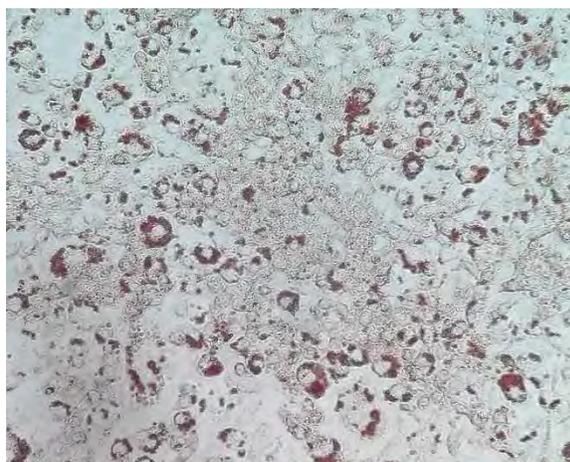
En la Figura 18 se observa la acumulación de lípidos durante la diferenciación en células 3T3-L1 tratadas con el extracto de *C. ficifolia* a una concentración de 0.125 mM. Los lípidos se tiñeron con rojo oleoso.



Día dos 0.125 mM



Día cuatro 0.125 mM



Día seis 0.125 mM



Día ocho 0.125 mM

Figura 18. Fotos a 20x en donde se observa la acumulación de lípidos en las células 3T3-L1 durante la diferenciación de fibroblastos a adipocitos, tratadas con el extracto acuoso de *C. ficifolia* a una concentración de 0.125 mM con base a su contenido en DQI. Los lípidos se tiñeron con rojo oleoso.

En las siguientes gráficas de la Figura 19 se observa que en el día 2 de diferenciación en las células 3T3-L1 tratadas con el extracto de *C. Ficifolia*, no hubo una diferencia significativa en la acumulación de lípidos con respecto a su control (día 2 sin tratamiento), mientras que en la del día 4 hubo una mayor acumulación de lípidos con la concentración de 0.25 mM del extracto. Posteriormente se observa que en los días 6 y 8 hay disminución de lípidos acumulados en comparación a sus respectivos controles, siendo significativamente diferentes a las concentraciones de 0.125 y 0.25 mM en el día 6, mientras que en día 8 las tres concentraciones dieron resultados significativamente menores ($p < 0.05$).

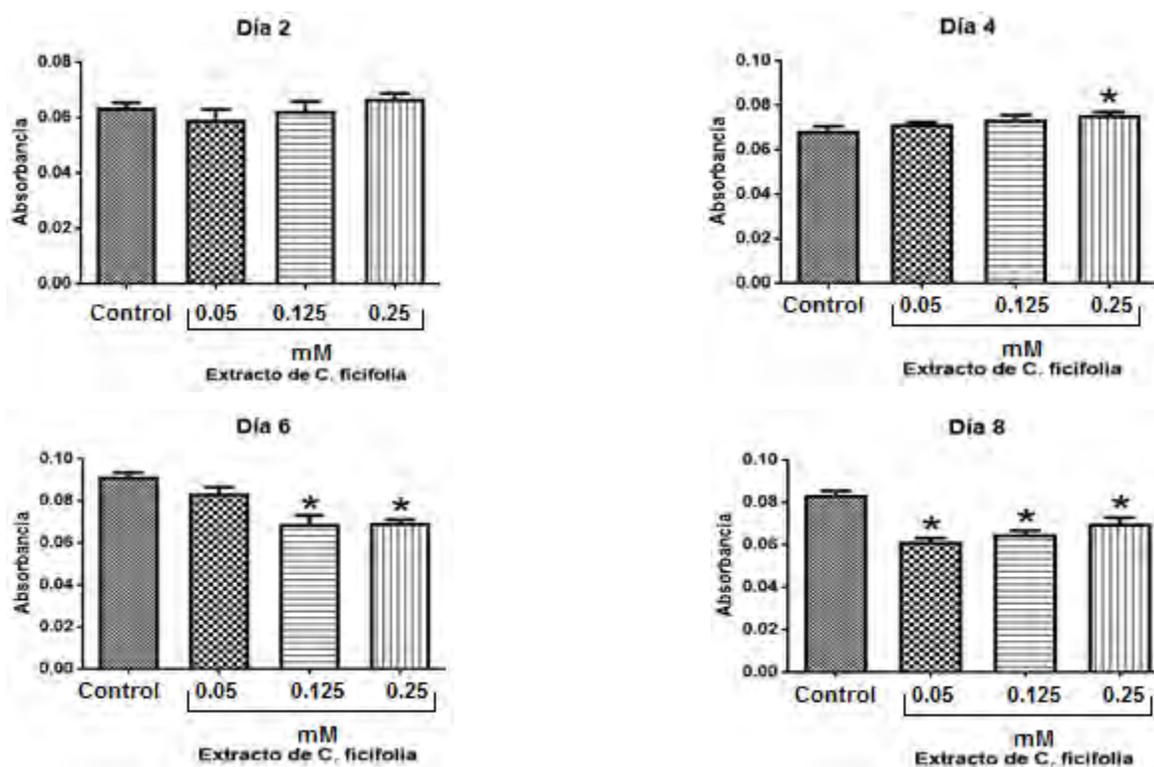


Figura 19. Acumulación de lípidos en las células 3T3L1 durante su diferenciación a adipocitos, tratados con extracto de *C. ficifolia*. Graficas que muestran la acumulación de lípidos a los diferentes tiempos (2, 4, 6 y 8 días) tratadas a diferentes concentraciones con el extracto acuoso de *C. ficifolia* (0.05, 0.125, y 0.25 mM con base a su concentración en DQI). El * indica una significancia menor de 0.05.

8. Discusión:

Se esperaba que en las células 3T3-L1 que no recibieron tratamiento como se observa en la Figura 4 pág. 48, la expresión del ARNm de PPAR γ tuviera un incremento significativo en cada día de diferenciación, ya que PPAR γ se considera un regulador maestro de la adipogénesis,³⁶ sin embargo solo el día ocho se incrementó significativamente, ya que este receptor se activa mediante ácidos grasos o ligandos endógenos como el oxLDL.⁴¹⁻⁴³ Esto podría deberse a que en los días dos, cuatro y seis se acumularan los lípidos sin liberación de ácidos grasos o sin que se oxidaran, y por esta razón, hasta el día ocho hubo un incremento considerable tanto de lípidos acumulados como de ácidos grasos libres, ya que es una de las características de los adipocitos maduros.

En la Figura 6 pág. 49 la expresión del ARNm de PPAR γ durante la diferenciación con tratamiento a diferentes concentraciones 0.05 mM, 0.125 mM y 0.25 mM, la concentración de 0.05 mM presentó un incremento significativo en los días dos, cuatro y seis, mientras que en el día ocho no hubo una diferencia significativa, por lo que a esta concentración los adipocitos liberaron más ácidos grasos u oxidaron las LDL.^{36,43} En cuanto al día 8 la concentración de 0.125 mM fue la única que tuvo un incremento significativo comparada con su control.

En las células sin tratamiento de la Figura 7 pág. 50 durante la diferenciación, como se esperaba, se observó incremento en la expresión del ARNm de Adiponectina conforme transcurrían los días, en donde el incremento significativo se observó a los días 6, 8 y 10. Como consecuencia en los últimos días de diferenciación la adiponectina estimula la oxidación de ácidos grasos y ejerce funciones de protección contra la inflamación.⁹³⁻⁹⁷

En las células que fueron tratadas con el extracto acuoso de *C. ficifolia* a diferentes concentraciones durante la diferenciación en la Figura 9 pág. 51, hubo una inhibición de la expresión del ARNm de adiponectina en el día dos a las tres concentraciones (0.05 mM, 0.125 mM y 0.25 mM), pero con la concentración de 0.25 mM la expresión de adiponectina siempre se vio inhibida en los días dos, cuatro, seis y ocho, posiblemente debido a que esta concentración afectó la diferenciación, teniendo una menor acumulación de lípidos, incremento en la expresión del ARNm de IL-6 y podría haber una disminución en el número de células, presentando un incremento similar a la inhibición de adipogénesis mediada por un quito-oligosacárido como se cita en la literatura.¹¹¹

En cuanto a los resultados de la expresión del ARNm de IL-6 en las células sin tratamiento de la Figura 10 pág. 52, hubo un incremento significativo solo en el día seis. Y se sabe que la producción de la IL-6 es estimulada principalmente por el TNF- α y las catecolaminas⁷⁴, ocasionando inflamación. Por otro lado, también ha habido estudios en donde las concentraciones elevadas de IL-6 presentan un efecto favorable ya que aumenta la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos libres (AGL), evitando los efectos dañinos sobre la señalización de la insulina.^{84,85}

En la Figura 12 pág. 53 se observó a las células que se les trató con el extracto acuoso durante la diferenciación, en donde la concentración de 0.25 mM fue la única con un incremento significativo en la expresión de IL-6 durante la diferenciación, mientras que la concentración de 0.125 mM su incremento fue en los días cuatro, seis y ocho. Y la concentración de 0.05 mM solo en el día seis. Además estos resultados van de acuerdo con los reportados en ratones diabéticos tratados con *C. ficifolia* mostrando un incremento en los niveles séricos de IL-6 y disminuyendo el peso corporal.¹¹²

La liberación de la proteína IL-6 liberada al medio de cultivo se incrementó significativamente hasta el día 10 de diferenciación de la Figura 13 pág. 54, lo cual fue diferente a lo que se observó en la expresión del ARNm de IL-6 ya que este se incrementó en el día 6, puede tenerse un desfase en la liberación del ARNm transcrito de IL-6. Mientras que en las células tratadas si hubo una concordancia en los días en que fue expresado el ARNm de IL-6 y el incremento de la proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo. El efecto anterior se observó con todas las concentraciones **C. ficifolia**, siendo la concentración de 0.25 mM a la que se encontraron los valores más elevados.

También se realizó un experimento en adipocitos ya maduros, como se observa en la Figura 15 pág. 56, donde a estos se les trato con el extracto acuoso de **C. ficifolia** a las mismas concentraciones por 48 horas, en donde se pudo observar que las concentraciones de 0.05 mM y 0.125 mM del ARNm de PPAR γ y adiponectina fueron las que presentaron un incremento significativo, siendo la primera concentración más elevada que la de 0.125 mM, mientras que la concentración de 0.25 mM se vio inhibida en adiponectina y en PPAR γ sin diferencia significativa, los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente con la concentración de 0.125 mM.¹¹³

En cuanto a los adipocitos maduros tratados con el extracto de **C. ficifolia** por 48 horas en la expresión del ARNm de IL-6 tuvo un incremento significativo a las concentraciones de 0.125 mM y 0.25 mM mientras que la proteína de IL-6 liberada al medio de cultivo tuvo un incremento significativo a las tres concentraciones.

Por lo que en este experimento el extracto de **C. ficifolia** a las 48 horas de tratamiento, la concentración de 0.05 mM fue la que presento un mejor efecto al incrementar la expresión del

ARNm de PPAR γ (reguladora de diferenciación) y de adiponectina (encargada de la actividad antiinflamatoria u oxidación de ácidos grasos). Además a esta concentración no se presentó incremento en la expresión del ARNm de IL-6, aunque la proteína de IL-6 liberada se incrementó significativamente pero en menor cantidad que a las concentraciones de 0.125 mM y 0.25 mM.

Por último, los lípidos acumulados en las células sin tratamiento como se observa en la Figura 17 pág. 58 se incrementaron en los últimos días de diferenciación (seis y ocho), debido a que los adipocitos van acumulando triglicéridos durante su maduración cuando el aporte energético es excesivo y se movilizan cuando se requieren para otras funciones del organismo.³²

Las células que fueron tratadas con el extracto acuoso en las siguientes gráficas de la Figura 19 pág. 60, no tuvieron una diferencia significativa con respecto a la cantidad de lípidos acumulados en los días dos y cuatro, excepto la concentración de 0.25 mM que presentó un incremento significativo, eso nos hace pensar que hasta este día los adipocitos tienen un máximo en la acumulación de TG, mientras que en los días seis y ocho hay una disminución en la acumulación de TG con una diferencia significativa a las tres concentraciones excepto la concentración de 0.05 mM al día seis. Esta disminución de TG se puede deber a que se esté inhibiendo la diferenciación en presencia del extracto.

Por otro lado la disminución en la acumulación de lípidos puede ser debida a la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación) y no tanto por la liberación de ácidos grasos libres, ya que estos deberían disminuir la actividad de glutatión peroxidasa.¹¹³ y esto no se observó en investigaciones previas, al contrario la presencia del extracto incrementa la actividad de

glutación peroxidasa en adipocitos 3T3-L1 para protegerlos del daño oxidativo, además de disminuir la actividad de vías proinflamatorias. ¹¹³

9. Conclusiones:

- ✚ En el presente estudio se logró observar cómo actúa el extracto acuoso de ***C. ficifolia*** durante la diferenciación en adipocitos, en donde las concentraciones de 0.05 mM y 0.125 mM son las más recomendables para usar, ya que hay una menor acumulación de lípidos como se observa en la Figura 19 pág. 60 y un incremento en la expresión del ARNm de adiponectina, PPAR γ e IL-6 (Figuras 6, 9 y 12 pág. 49,51 y 53) durante la diferenciación.
- ✚ El extracto de ***C. ficifolia*** afecta la diferenciación a adipocitos, debido a que PPAR γ disminuye en el día ocho de diferenciación y disminuye también la acumulación de los lípidos, esta última disminución no se sabe con exactitud si es debida a la oxidación de ácidos grasos, por lo que faltaría su determinación experimental, ya que anteriormente se ha mostrado que el extracto presenta un efecto hipoglucemiante gracias al compuesto DQI y evitando así la resistencia a la insulina ocasionada por los ácidos grasos.
- ✚ En una investigación realizada anteriormente por Fortis,¹¹³ comprobó que el extracto también posee propiedades antioxidantes incrementando la actividad de glutatión peroxidasa, en donde su principal papel biológico es proteger el organismo de daño oxidativo, al contrario del H₂O₂, TNF- α y ácidos grasos libres que disminuyen su actividad.¹¹³ Por lo tanto este extracto podría ser usado para el tratamiento contra la obesidad y DT2, ya que posee propiedades antioxidantes, hipoglucemiantes (realizadas anteriormente) y propiedades antiinflamatorias determinadas en este experimento.

10. Perspectivas:

- ❖ Se propone determinar experimentalmente la β -oxidación, los ácidos grasos libres en el medio de cultivo, la actividad de NF- κ B y la viabilidad de los adipocitos tratados con ***C. ficifolia***.
- ❖ También se propone separar los componentes del extracto de ***C. ficifolia***. Para evaluarlos y determinar cuál o cuáles de ellos son los responsables que están afectando la expresión de IL-6.

11. Referencias

1. Douketis JD, Sharma AM. Obesity and cardiovascular disease: pathogenic mechanisms and potential benefits of weight reduction. *Semin. Vasc. Med.* 2005; 5(1): 25-33.
2. Uscategui RM, Pérez JA, Ristizabal JC, Camacho JA. Excess of weight and their relationship with high blood pressure in schoolchildren and adolescents of Medellin, Colombia. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2003; 53(4): 376-382.
3. Marcos ML, Francisco JR, Marín A, Vecchione ER. Adiponectina y sus efectos pleiotrópicos en el sistema cardiovascular. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.* 2009; 7(3): 3-9
4. Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter SV, Smith U. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acids.* 2005; 73(1): 65-75.
5. Yu Y, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis. Sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ. Res.* 2005; 96(10): 1042-1052.
6. World Health Report. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. World Health Organisation: Geneva, 2002.
7. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444(7121): 860-7.
8. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008; 454(7203): 428-35.
9. Ezquerro EA, Castellano JM, Barrero AA. Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Rev. Esp. Cardiol.* 2008; 61(7): 752-64.

10. Weisberg S, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel R, Ferrante A. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(12): 1796-808.
11. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6 (10): 772-83.
12. Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Path G, Hauner H, Tsokos M, et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes.* 2000; 49(4): 532–8.
13. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(12): 1821–30.
14. Wellen K, Hotamisligil G. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(12): 1785-8.
15. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid. Res.* 2005; 46(11): 2347-55.
16. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes.* 2007; 56(12): 2910-8.
17. Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodelling. *Future Lipidol.* 2008; 3(5): 545–56.
18. Ohlin A, Rossner S. Maternal body weight development after pregnancy. *Int. J. Obes.* 1990; 14(2):159-173.

19. WHO. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, WHO, 2000.
20. NIH Pub N° 98-4083. Clinical Guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in Adults. *Obes. Res.* 1998; 6(6):464.
21. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003a. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab. Care.* 2003; 26(1): S5-S20.
22. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al. Followup report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diab. Care.* 2003; 26(11): 3160-3167.
23. WHO. (World Health Organization) Department of noncommunicable disease surveillance. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Geneva. WHO/NCD/NCS/99.2 pp 1-66.
24. Edelstein SL, Knowler WC, Bain RP, Reubin A, Barret-Connor EL, Dowse GK, et al. Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM. *Diabetes.* 1997; 46(4):701-710.
25. Committee Report. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab. Care.* 1997; 20(7): 1183-1197.
26. Draznin B. Molecular biology of diabetes. 1st edn. Vol I. Human Press, New Jersey, 1994; 303-332.
27. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diab. Care.* 1998; 21(9):1414–1431.
28. WHO: World Health Organization [Internet]. México: WHO; c2015 [citado 20 nov 2015]. Diabetes [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <http://www.who.int/diabetes/en/>

29. Wrigth EJR, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress on type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycemia. *J. Clin. Pract.* 2006; 60(3): 308-314.
30. Kumar Das S, Elbein SC. The genetic basis of type 2 diabetes. *Cell. Science.* 2006; 2(4):100-131.
31. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444(7121): 860-867.
32. Mercedes GH, Blanca BR, Bertha RM, Sergio G, Arturo P. Funciones endocrinas de la célula adiposa. *Endocrino y Nutr.* 2002; 10(3):1-7.
33. Frühbeck G, Gómez AJ, Muruzábal FJ, Burell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; 280(6): E827-E847.
34. Ahima SR, Flier SJ. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000; 11(8): 327-332.
35. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroidhormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347(6294): 645–650.
36. Ren DL, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. PPAR gamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPAR gamma 2 but not PPAR gamma 1 reactivates adipogenesis. *Genes Develop.* 2002; 16(1): 27–32.
37. Vidal Puig A et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(11): 2553–2561.
38. Vidal Puig AJ et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 1997; 99(10): 2416–2422.

39. Auboeuf D et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*. 1997; 46(8): 1319–1327.
40. Loviscach M et al. Distribution of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia* 2000; 43(3): 304–311.
41. Forman BM et al. 15-Deoxy-delta (12,14)-prostaglandin J(2) is a ligand for the adipocyte determination factor ppar-gamma. *Cell*. 1995; 83(5): 803–812.
42. Kliewer SA et al. A prostaglandin J(2) metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995; 83(5): 813–819.
43. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen HW, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell* 1998; 93(2): 229–240.
44. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 1999; 20(5): 649–688.
45. Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2001; 70: 341–367.
46. Ibrahim A et al. Evidence for a common mechanism of action for fatty acids and thiazolidinedione antidiabetic agents on gene expression in preadipose cells. *Mol. Pharmacol.* 1994; 46(6): 1070–1076.

47. Bays H, González J, Bray G, Kitabchi A, Bergman D, Schorr A, *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2008; 6(3): 343-68.
48. Bays HE, Chapman RH, Grande S. The relationship of body mass index to diabetes *mellitus*, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys. *Int. J. Clin. Pract.* 2007; 61(5): 737-47.
49. De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ.* 2007; 85(9): 660-7.
50. Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The “metabolically obese”, normal-weight individual. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981; 34(8): 1617-21.
51. Karelis AD, Faraj B, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud’homme D. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90(7): 4145-50.
52. Cinti S. The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2006; 16(8): 569-74.
53. Karelis AD, St-Pierre DH, Conus F, Rabasa-Lhoret R, Poehlman ET. Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: What do we know? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2569-75.
54. Doelle G. The clinical picture of metabolic syndrome. An update on this complex of conditions and risk factors. *Posgrad. Med.* 2004; 116(1): 30-8.
55. Chacín L, Chacín N, Chapín J. Vigencia del síndrome metabólico. *Diab. Int.* 2009; 1(4): 86-98.

56. Despres JP. Health consequences of visceral obesity. *Ann. Med.* 2001; 33(8): 534-41.
57. Frayn KN. Adipose tissue and the insulin resistant syndrome. *Proc. Nutr. Soc.* 2001; 60(3): 375-80.
58. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts Type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 2000; 43(12): 1498-1506.
59. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2583–9.
60. Bays H, Blonde L, Rosenson R. Adiposopathy: how do diet, exercise and weight loss drug therapies improve metabolic disease in overweight patients? *Cardiovasc. Ther.* 2006; 4(6): 871-95.
61. Tan GD, Goossens GH, Humphreys SM, Vidal H, Karpe F. Upper and lower body adipose tissue function: A direct comparison of fat mobilization in humans. *Obes. Research.* 2004; 12(1): 114–8.
62. Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao O, Lumsden AB, Chen C. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: Implication of vascular disease. *J. Surg. Res.* 2005; 126(1): 121–9.
63. Schäffler A, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Büchler C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocrinol. Rev.* 2006; 27(5): 449-67.
64. Miner JL. The adipocyte as an endocrine cell. *J. Anim. Sci.* 2004; 82(3): 935-41.
65. Bellizzi MC, Dietz WH. Workshop on childhood obesity: summary of the discussion. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 70(1): 173s–5s.

66. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *British Med. J.* 2000; 320(7244): 1240–3.
67. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005; 365(9468): 1415-28.
68. Shiwaku K, Anuurad E, Enkhmaa B, Kitajima K, Yamane. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet.* 2004; 363(9403): 157-63.
69. Zimmet G, Alberti KG, Serrano M. Una definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: Fundamentos y resultados. *Rev. Esp. Cardiol.* 2005; 58(12): 1371-6.
70. Chacín L, Chacín N, Chapín J. Vigencia del síndrome metabólico. *Diab. Int.* 2009; 1(4): 86-98.
71. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz W H. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents. Finding from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2003; 157(8): 821-7.
72. McCarthy HD, Ellis SM, Cole TJ. Central overweight and obesity in British youth aged 11 – 16 years: cross sectional surveys of waist circumference. *British Med. J.* 2003; 326(7390): 624–7.
73. Mora-Orta S, Corado J. *Inmunología actual: Bases fisiológicas para la comprensión de las alteraciones del sistema inmunitario.* 1ra ed. Valencia-Venezuela: Alfa Impresores. 2003; 142-145.

74. Marcano Y, Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairet C, Maldonado M. Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.* 2006; 4(1): 15-21.
75. Pérez MM. El adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Rev. Med.* 2007; 15(2): 225-42.
76. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS: Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83(3): 847–50.
77. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85(9): 3338–42.
78. Kershaw E, Flier J. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2548-56.
79. Kroder G, Bossenmaier B, Keller M, Capp E, Stoyanov B, Muhlofer A, et al. Tumor necrosis factor-alpha and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signalling. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(6): 1471-7.
80. Mooney Ra, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, Shang Y, et al. Suppressors of cytokine signaling-1 and IL-6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(28): 25889-93.
81. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 2006; (1): 4-12.

82. Bastard JP, Jardel C, Delattre J, Hainque B, Bruckert E, Oberlin F. Evidence for a link between adipose tissue IL-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation*. 1999; 99(16): 2221-2.
83. Valle M, Martos R, Morales R. Obesidad infantil: ¿una situación de riesgo? *Rev. Esp. Obes.* 2005; 3(6): 340-51.
84. Lyngso D, Simonsen L, Bulow J. Metabolic effects of interleukin-6 in human splanchnic and adipose tissue. *J. Physiol.* 2002; 543(1): 379–386.
85. Van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88(7): 3005–3010.
86. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* 2002; 8(1): 75–79.
87. Rotter V, Nagaev I, and Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(46): 45777–45784.
88. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, and Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002; 51(12): 3391–3399.
89. Stouthard JM, Oude Elferink RP, and Sauerwein HP. Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 220(2): 241–245.
90. Stouthard JM, Romijn JA, Van der Poll T, Endert E, Klein S, Bakker PJ, et al. Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1995; 268(5): E813–E819, 1995.

91. Steensberg A, Fischer CP, Sacchetti M, Keller C, Osada T, Schjerling P, et al. Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. *J. Physiol.* 2003; 548(2): 631–638.
92. Scherer P.E, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(45): 26746-26749.
93. Hu, E.; Liang, P.; Spiegelman, B.M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(18): 10697-10703.
94. Lara-Castro C, Fu Y, Chung B.H, Garvey W.T. Adiponectin and the metabolic syndrome: Mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2007; 18(3): 263-270.
95. Oh, D.K.; Ciaraldi, T.; Henry, R.R. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes. Metab.* 2007; 9(3): 282-289.
96. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(40): 37487-37491.
97. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 2003; 107(5): 671-674.
98. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 257(1): 79-83.
99. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(6): 2764-2769.

100. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20(6), 1595-1599.
101. Fasshauer M, Kralish S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003; 301(4):1045-1050.
102. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 285(3): E527-E533.
103. Takemura Y, Ouchi N, Shibata R, Aprahamian T, Kirber MT, Summer RS, et al. Adiponectin modulates inflammatory reactions via calreticulin receptor-dependent clearance of early apoptotic bodies. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(2): 375-86.
104. Argaez LN, Wachter NH, Kumate RJ, Cruz M, Talavera J, Rivera AE, et al. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diab. Care.* 2003; 26(8): 2470-2471.
105. Hernández E, Aguilar A, Aguilar L, Román R, Chávez AA, García LM, et al. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2002; 45: 118-124.
106. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 99(3): 325-348.
107. Xia T, Wang Q. D-chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006; 58(11): 1527-1532

108. Fortis-Barrera M.A. Efecto de *Cucurbita ficifolia* sobre el estrés oxidativo, inflamación y activación de PKB en adipocitos 3T3-L1 [Tesis]. México D.F.: UAM-I 2013.
109. ensanut.insp.mx [internet]. Obesidad en adultos: los retos de la cuesta abajo; 2012 [actualizado en el 2012; citado 13 de febrero del 2016]. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/ObesidadAdultos.pdf>
110. Chomczynski P, Sacchi N. single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.
111. Bahar B, O'Doherty JV, Sweeney T. A potential role of IL-6 in the chito-oligosaccharide-mediated inhibition of adipogenesis. *Br. J. Nutr.* 2011; 106(8): 1142–1153.
112. Román RR, Almanza JC, Fortis BA, Angeles MS, Banderas TR, Zamilpa AA, *et al.* Antioxidant and anti-Inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in streptozotocin induced diabetes mice. *Am. J. Chin. Med.* 2012; 40(1): 97–110.
113. Fortis BA, Alarcón FJ, Díaz FM, Román RR, Cruz M, García MR, *et al.* *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 2013; 65(10): 1563-76.