



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOBRE LA GLUCEMIA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE DOS CUCURBITACINAS AISLADAS DE *Ibervillea lindheimeri* Y SUS DERIVADOS ACETILADOS

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
SONIA ELIZABETH HERNÁNDEZ NAVIA

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
DEPARTAMENTO MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Mariano Martínez Vázquez en el Departamento de Química de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización de este proyecto se recibió la beca CONACyT para Sonia Elizabeth Hernández Navia con número (becario/apoyo): 583088/415231. Además, se contó con apoyos institucionales del Instituto de Química para el Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Índice

Índice	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	4
<i>Ibervillea lindheimeri</i>	5
Cucurbitacinas	5
Captación de glucosa post-prandial: Glut4	7
Hipótesis	8
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos particulares	9
Materiales y métodos	9
Material vegetal	9
Aislamiento y síntesis	9
Animales experimentales	11
Inducción química de diabetes	11
Medición de glucemia y curva de tolerancia a glucosa	12
Establecimiento del efecto de los compuestos sobre la translocación de Glut4	13
Establecimiento del efecto de los compuestos en los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a membrana plasmática	14
Prueba de tolerancia a piruvato	15
Análisis estadístico	16
Acoplamiento molecular	16
Resultados y discusión	17
Extracción, aislamiento y síntesis	17

Establecimiento del efecto sobre la glucemia del extracto de AcOEt en un modelo de diabetes.....	20
Evaluación del efecto sobre la glucemia de las cucurbitacinas 1-4.....	21
Evaluación del efecto de los compuestos 1, 2 y 4 en la translocación de Glut4 a membrana plasmática de músculo sóleo y tejido adiposo epidídimal.....	24
Evaluar el efecto de 1, 2 y 4 en los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a MP en MS y TAE.....	28
Acoplamiento molecular	35
Evaluación del efecto sobre la producción de glucosa a partir de piruvato de las cucurbitacinas 1, 2 y 4.....	40
Otros resultados	42
Conclusiones.....	45
Referencias.....	45
Anexos.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de química de las cucurbitacinas.	6
Figura 2. Ruta de señalización para la translocación de Glut4 a la membrana plasmática.....	8
Figura 3. Estructura química de los triterpenos cucurbitanos aislados del extracto de AcOEt de <i>I. lindheimeri</i>	19
Figura 4. Estructura química de la cucurbitacina L aislada del extracto de AcOEt de <i>I. lindheimeri</i>	20
Figura 5. Efecto sobre la glucemia del extracto de acetato de etilo de la raíz de <i>I. lindheimeri</i>	21
Figura 6. Curva dosis respuesta de 1 en el grupo NDM.	22
Figura 7. Efecto sobre la glucemia de las cucurbitacinas 1-4.	23
Figura 8. Efecto sobre la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) de las cucurbitacinas aisladas del extracto de AcOEt de la raíz de <i>I. lindheimeri</i>	27
Figura 9. Determinación del efecto de las cucurbitacinas sobre los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4.	32
Figura 10. Unión de los compuestos 1 y 2 a AKT y AMPK.	39
Figura 11. Mecanismo de acción tejido dependiente propuesto para las cucurbitacinas aisladas de <i>I. lindheimeri</i>	40
Figura 12. Efecto sobre la producción de glucosa a partir de piruvato de las cucurbitacinas 1, 2 y 4.	41
Figura 13. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 23,24-dihidrocucurbitacina D(1), Acetato de 23,24-dihidrocucurbitacina D (3), 2- <i>O</i> -glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D(2), acetato de 2- <i>O</i> -glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D(4). ** $p \leq 0.01$ vs TPA.	43
Figura 14. Actividad antiproliferativa de las cucurbitacinas aisladas de <i>I. lindheimeri</i> y sus derivados acetilados.	44

Índice de tablas

Tabla A. Tratamientos y grupos experimentales utilizados para evaluar la actividad sobre la glucemia de AcOEt	12
Tabla B. Tratamientos y grupos experimentales utilizados para evaluar la actividad de 1-4 sobre la glucemia.....	13
Tabla C. Tratamientos y dosis utilizados en la evaluación de la translocación del Glut4 a la membrana plasmática.	13
Tabla D. Tratamientos y grupos experimentales utilizados para evaluar la actividad de 1, 2 y 4 sobre gluconeogénesis (producción de glucosa a partir de piruvato).....	16
Tabla E. Rendimientos de extractos a partir de las colectas de raíz de <i>I. lindheimeri</i>	17
Tabla F. Rendimiento de compuestos aislados a partir del extracto de AcOEt de la raíz de <i>I. lindheimeri</i>	18
Tabla G. Resultados del análisis de acoplamiento de los compuestos 1, 2 y 3.	38

Índice de Anexos

Anexo I. Espectro de RMN de la 23, 24- dihidrocucurbitacina D (1).....	53
Anexo II. Espectro de RMN de la 2,16-diacetil 23, 24- dihidrocucurbitacina D (3).....	54
Anexo III. Espectro de RMN de la 2-O- β glucopiranosil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (2) .	55
Anexo IV. Espectro de RMN de la 2-O- β - (2 ' , 3' , 4 ' , 6' tetracetil) glucopiranosil, 16 acetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (4).....	56

Resumen

En México existe una gran tradición en el uso de plantas medicinales contra la diabetes; las especies del género *Ibervillea* conocidas en la medicina popular mexicana como “wereque” tienen una amplia historia etnobotánica como agentes antidiabéticos. Estudios previos realizados por nuestro grupo indicaron que el extracto de acetato de etilo de raíces de *Ibervillea lindheimeri* (Cucurbitaceae) contiene triterpenos tetracíclicos conocidos como cucurbitacinas. Algunos cucurbitanos han sido reconocidos por su actividad hipoglucemiante. En el presente trabajo evaluamos el efecto sobre la glucemia del extracto de acetato de etilo de *I. lindheimeri* y de sus principales metabolitos secundarios: la 23, 24-dihidrocucurbitacina D (1) y la 2-O- β -glucopiranosil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (2); adicionalmente se evaluaron los derivados acetilados 2,16-diacetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (3) obtenida a partir de 1, y 2-O- β - (2', 3', 4', 6' tetracetil) glucopiranosil, 16 acetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (4) sintetizada a partir de 2. También se determinaron los mecanismos de acción *in vivo* de las cucurbitacinas activas 1, 2 y 4. Nuestros resultados mostraron que el extracto de acetato de etilo posee actividad antihiperoglucemiante. Los compuestos 1, 2 y 4 reducen la glucemia en ratones CD1 diabéticos en comparación con el grupo control diabético. Las cucurbitacinas promovieron la translocación de Glut4 a la membrana plasmática tanto en el músculo sóleo como en el tejido adiposo del epidídimo de manera independiente de la insulina. La translocación de Glut4 es inducida tanto por la activación directa de AMPK en músculo sóleo como por la activación de AMPK y AKT en tejido adiposo. Estos resultados indican que las cucurbitacinas aisladas 1 y 2 son responsables de las propiedades antidiabéticas de *I. lindheimeri* ejercidas principalmente sobre el tejido adiposo y llaman la atención sobre esta especie como una nueva planta antidiabética y fuente de compuestos antidiabéticos.

Adicionalmente, se evaluó la actividad citotóxica y antibacteriana de estos compuestos, y se aislaron nuevos compuestos no reportados en esta especie.

Abstract

There is a great tradition in the use of medicinal plants against diabetes in Mexico; the species of the genus *Ibervillea* known in Mexican folk medicine as "wereque" have a long ethnobotanical history as antidiabetic agents. Previous studies of our group indicated that the ethyl acetate extract from the roots of *I. lindheimeri* contains tetracyclic triterpenes known as cucurbitacins. Some Cucurbitane members have been recognized for their hypoglycemic activity. In this work, we evaluate the effect on glycemia of the ethyl acetate extract and its main secondary metabolites: 23, 24-dihydrocucurbitacin D (**1**) and 2-O- β glucopyranosyl 23, 24-dihydrocucurbitacin D (**2**); additionally, the acetylated derivatives 2,16-diacetyl 23, 24-dihydrocucurbitacin D (**3**) obtained from **1**, and 2-O- β - (2', 3', 4', 6' tetracetyl) glucopyranosyl, 16 Acetyl 23, 24-dihydrocucurbitacin D (**4**) synthesized from **2** were also evaluated. The *in vivo* action mechanisms of active cucurbitacins **1**, **2** and **4** were also determined. Our results showed that the ethyl acetate extract possesses antihyperglycemic activity. Compounds **1**, **2**, and **4** lower blood glucose in diabetic CD1 mice compared to diabetic control group. Active cucurbitacins promoted the translocation of Glut4 to the plasma membrane both in the soleus muscle and in the epididymal adipose tissue independently of insulin. Glut4 translocation is induced by direct activation of AMPK in soleus muscle and by activation of AMPK and AKT in adipose tissue. These results indicate that the isolated cucurbitacins are responsible for the antidiabetic properties of *I. lindheimeri* exerted mainly on adipose tissue and call for attention to this species as a new antidiabetic plant, source of antidiabetic compounds.

In addition to the main objective, the cytotoxic and antibacterial activities of these compounds were evaluated. Also, new compounds not reported in this species were isolated.

Introducción

La prevalencia de diabetes *mellitus* está creciendo exponencialmente en todo el mundo a una proporción epidémica; esta enfermedad se caracteriza por una hiperglucemia crónica debido a un defecto en la producción, secreción y/o uso de insulina¹. Los tratamientos actuales tienen efectos secundarios importantes haciendo necesarias ciertas medidas de farmacovigilancia²; por lo tanto se requiere de una búsqueda continua de nuevos fármacos para el tratamiento de este padecimiento. En este contexto, las plantas medicinales, particularmente en países en vías de desarrollo, juegan un rol importante en el manejo y tratamiento de esta enfermedad^{3,4}. En México, el uso de remedios tradicionales juega un papel primordial como agentes terapéuticos contra la diabetes. Esto debido, principalmente, a la falta de recursos y los altos costos de los sistemas de salud.

Tradicionalmente se ha utilizado a las especies del género *Ibervillea*, coloquialmente conocidos como “Wereque” por su actividad hipoglucemiante. Principalmente se ha estudiado a la *I. sonora* donde el efecto hipoglucemiante de los metabolitos aislados de esta planta han confirmado su uso tradicional como remedio contra la diabetes⁵⁻⁷. Además de *I. sonora* otras seis especies del género *Ibervillea* crecen en México⁸. Una de esas especies es *Ibervillea lindheimeri* (A. Gray) Greene. Las raíces secas y molidas de *I. lindheimeri* son similares tanto a la vista como al sabor a aquellas obtenidas de la planta medicinal *I. sonora*. Un estudio fitoquímico previo realizado por nuestro grupo demostró que *I. lindheimeri* sintetiza metabolitos secundarios tipo cucurbitano entre los que se encuentran la 23,24-dihidrocucurbitacina D, la 23,24-dihidrocucurbitacina F y la 2-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina D⁹.

En la literatura existen informes que sugieren que algunos cucurbitanos activan la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) la cual a su vez promueve la translocación de los transportadores de glucosa 4 (Glut4) a la membrana plasmática¹⁰. La AMPK es considerada un detector de energía celular, el cual ayuda al balance energético de la célula el cual se activa con el aumento de relación AMP-ATP^{11,12}.

Tomando en consideración lo anterior se decidió establecer el efecto del extracto de AcOEt de *Ibervillea lindheimeri* y sus compuestos mayoritarios sobre la glucemia, y

en los segundos mensajeros involucrados en la translocación del Glut4 a la membrana plasmática.

Adicionalmente, se evaluaron la actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer humano y de inhibición de factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa* de estos compuestos. También se da a conocer el aislamiento de la 2,16-diacetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D y la cucurbitacina L; compuestos no reportados en esta especie.

Antecedentes

La diabetes *mellitus* es una de las enfermedades de más rápido crecimiento en todo el mundo y se prevé que para 2045 afectará a 693 millones de adultos. Este padecimiento es un trastorno metabólico de etiología indeterminada, caracterizado por hiperglucemia crónica debido a un defecto en la producción, secreción y/o uso de insulina¹ lo que provoca un desequilibrio en la homeostasis de la glucosa derivando en alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas¹³⁻¹⁵. Eventualmente da lugar a enfermedades como ceguera, falla renal, daño a los nervios y enfermedades crónicas degenerativas principalmente cardiovasculares como arterosclerosis^{6,15-17}.

Hoy en día se tiene un diverso grupo de medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, estos fármacos tienen importantes efectos secundarios lo que los hace inconvenientes². Por la cual se continúa con la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento de esta enfermedad. Una aproximación para obtener nuevos fármacos la constituye el estudio de las plantas medicinales con antecedentes etnobotánicos para tratar la diabetes. Es conocido que las propiedades medicinales de estas especies vegetales se deben a la presencia de ciertos metabolitos secundarios que estas especies sintetizan. Por lo anterior, las plantas medicinales juegan un rol importante en el manejo y tratamiento de *diabetes mellitus*, particularmente en países en vías de desarrollo^{3,8}.

Ibervillea lindheimeri

En México, tradicionalmente se ha utilizado, por su actividad hipoglucemiante⁹, a la *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene, coloquialmente conocida como “wereque”. Las propiedades antidiabéticas de *I. sonora*, han sido confirmadas al evaluar las propiedades hipoglucemiantes de los metabolitos secundarios obtenidos de esta planta^{7,19,20}. Además de *I. sonora* otras seis especies del género *Ibervillea* crecen en México⁸; una de estas especies es *Ibervillea lindheimeri* (A. Gray) Greene, la cual tiene raíces que al secarse y molerse tiene aspecto y sabor similar a *I. sonora*.

I. lindheimeri es una enredadera perenne delgada, rastrera o trepadora con zarcillos; produce pequeñas flores amarillas en verano y frutos color naranja a rojo brillante de 2-3.5 cm de diámetro en otoño, tiene hojas lobuladas de color verde oscuro se encuentran dispersas a lo largo de los tallos ramificados. Crece a partir de un gran cáudice grueso, casi globoso o algo aplanado, en las plantas más viejas miden hasta 35 cm de diámetro.²¹ El cáudice es utilizado en medicina tradicional para obtener tinturas, te, o en forma de cápsulas llenas con el cáudice pulverizado para tratar diabetes y cáncer entre otras enfermedades.

El estudio de los de los componentes químicos de *I. lindheimeri* realizado por nuestro grupo mostro que el extracto de AcOEt de las raíces posee metabolitos secundarios del tipo cucurbitano entre los que se encuentran la 23,24-dihidrocucurbitacina F ($C_{30}H_{48}O_7= 520.70$ g/mol), la 23,24-dihidrocucurbitacina D (**1**) ($C_{30}H_{46}O_7= 518.60$ g/mol) (

Figura 1C), y la 2-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina D (**2**) ($C_{36}H_{56}O_{12}= 680.83$ g/mol)⁹(

Figura 1D).

Cucurbitacinas

Las cucurbitacinas son un grupo de compuestos triterpenoides aislados originalmente como los compuestos amargos de especies de la familia Cucurbitácea. Estos triterpenoides están extensamente distribuidos en el reino vegetal, donde actúan como feromonas químicas heterólogas que protegen a las plantas de factores ambientales como la depredación, infecciones y estrés hídrico ²². La concentración de cucurbitacinas varía entre los tejidos. Pueden concentrarse en frutas y raíces de plantas maduras. Por ejemplo, en las frutas donde se producen cucurbitacinas, su mayor concentración se logra en la madurez. Las semillas generalmente contienen una concentración muy baja de estos triterpenos. La mayoría de las cucurbitacinas son solubles en éter de petróleo, cloroformo, benceno, acetato de etilo, metanol y etanol, pero son insolubles en éter.

Los cucurbitanos se caracterizan por un núcleo tetracíclico 19-(10->9b)-abeo-10 α -lanosto-5-eno (núcleo de cucurbitano); una característica común entre las cucurbitacinas es la presencia de un doble enlace entre C5 y C6. Estos triterpenos se diferencian del núcleo esteroideo en el hecho de que en el esqueleto cucurbitano un grupo metilo se encuentra en C-9 en lugar de C-10 (

Figura 1A). La diversidad de las cucurbitacinas radica en la variedad de sus derivados de cadena lateral; otras características importantes que los difieren de la mayoría de los otros triterpenos tetracíclicos es ser altamente insaturados y contener numerosos grupos ceto-, hidroxil- y acetoxi- como sustituyentes en el núcleo cucurbitano. Esta diversidad de sustituyentes oxigenados contribuye a sus diversas acciones farmacológicas²³; en la actualidad se han documentado propiedades antiinflamatorias, antitumorales e hipoglucemiante para estos compuestos²⁴.

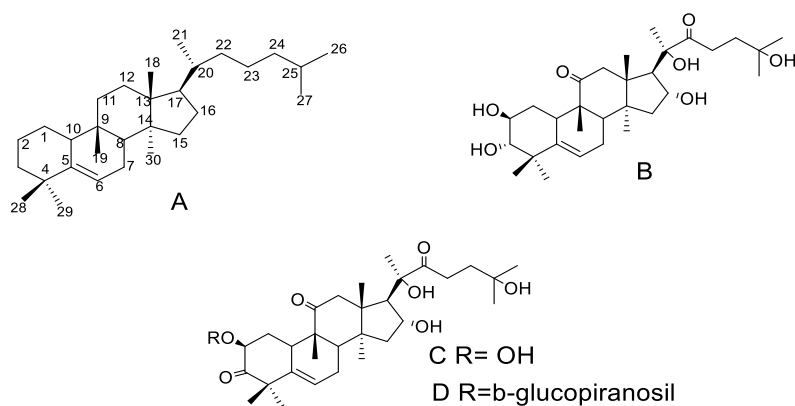


Figura 1. Estructura química de las cucurbitacinas. A) Estructura general del esqueleto cucurbitano (Tomado de Chen, *et al*, 2015). B) Estructura química de la 23, 24- dihidrocucurbitacina F. C) Estructura química de la 23, 24- dihidrocucurbitacina D (**1**). D) Estructura química de la 2-*o*- β glucopiranosil 23, 24 dihidrocucurbitacina D (**2**).

Particularmente los compuestos cucurbitanos aislados de la fruta asiática *Momordica charantia* han mostrado poseer actividad hipoglucémica²⁴. Tan *et al* (2008) determinaron que la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es el mecanismo de acción *in vitro* de estos compuestos, favoreciendo entre otras cosas, el incremento de la translocación del Glut4 a la membrana plasmática¹⁰. Este descubrimiento es particularmente interesante en relación con la diabetes y obesidad

porque la activación de AMPK aumenta la oxidación de ácidos grasos, inhibe la síntesis de lípidos y puede mejorar la acción de la insulina²⁵, adicionalmente las cucurbitacinas han sido asociadas con la regulación del metabolismo del glucógeno hepático^{26,27}.

Captación de glucosa post-prandial: Glut4

El principal mecanismo celular que disminuye la glucemia cuando se ingieren carbohidratos es el transporte de glucosa al músculo esquelético y al tejido adiposo. El Glut4 es un transportador transmembranal encargado de facilitar el paso de la glucosa al interior de la célula (difusión facilitada) y es un regulador clave en la homeostasis de glucosa en todo el cuerpo. La principal proteína transportadora que media la captación de glucosa post-prandial es el Glut4. En condiciones basales este transportador se encuentra dentro de vesículas en el citosol las cuales son translocadas a la membrana plasmática tras recibir un estímulo. La translocación del Glut4 puede ser activada por la insulina, la cual estimula la activación de la proteína cinasa B (AKT β) mediante dos mediadores: la proteína cinasa dependiente de fosfoinositido (PI3K) y el complejo 2 del blanco de rapamicina en mamíferos (mTORC2)²⁸⁻³⁰. La activación de la AMPK también regula positivamente la translocación de Glut4; esta puede activarse mediante un aumento de AMP en la proporción AMP/ATP (baja de energía), por la vía de la quinasa hepática B1 (LKB1 por sus siglas en inglés)³¹ o un elevado nivel de calcio intracelular lo cual lleva a la activación de AMPK y la CAMKK γ (Proteína cinasa dependiente de Ca²⁺ cinasa)³². Las rutas de señalización de AKT β y AMPK convergen en una ruta común ambas proteínas pueden fosforilar al sustrato de AKT de 160 kDa (AS160) en diversos sitios promoviendo la unión de las proteínas 14-3-3 que inhabilita la actividad de AS160 de inhibir Rab-Gap. La inhibición de GAP promueve el cambio de conformación de Rab menos activa a su forma más activa la cual permite que las vesículas de Glut4 se muevan y difundan a la membrana plasmática ^{33,34} (Figura 2). La falla en la translocación del Glut4 a la membrana plasmática es uno de los primeros pasos en el desarrollo de resistencia a la insulina y Diabetes *mellitus* tipo 2.

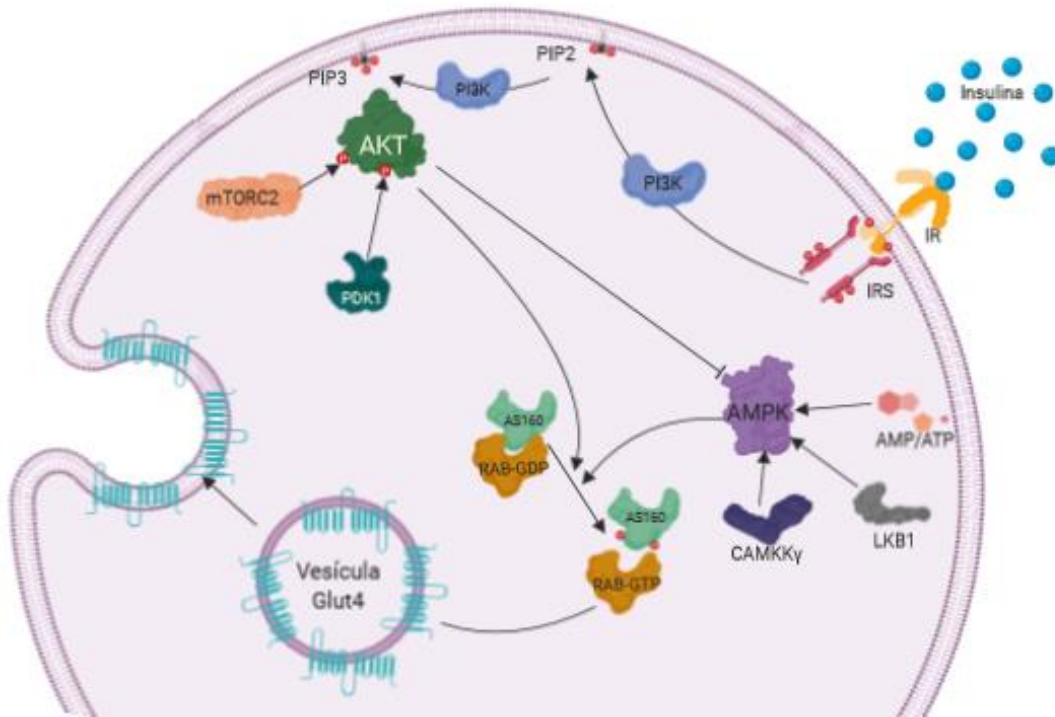


Figura 2. Ruta de señalización para la translocación de Glut4 a la membrana plasmática. Diseño original creado con BioRender.com.

Tomando en cuenta los antecedentes anteriores, en este estudio se propone que el extracto de acetato de etilo (AcOEt) de *I. lindheimeri* y sus compuestos mayoritarios podrían tener un efecto hipoglucemiante independiente de insulina en un modelo de diabetes inducida. Para esto, se evaluaron el efecto del extracto de AcOEt de *I. lindheimeri* así como sus compuestos mayoritarios sobre la glucemia y segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a la membrana plasmática.

Hipótesis

Los cucurbitanos aislados del extracto de AcOEt de *Ibervillea lindheimeri* tendrán un efecto hipoglucemiante, independiente de insulina, en un modelo de diabetes inducida.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto de AcOEt de *Ibervillea lindheimeri* y sus compuestos mayoritarios sobre la glucemia y segundos mensajeros involucrados en la translocación del transportador de glucosa 4 a la membrana plasmática.

Objetivos particulares

1. Obtener el extracto de AcOEt de la raíz de *I. lindheimeri*.
2. Establecer el efecto sobre la glucemia del AcOEt en un modelo de diabetes.
3. Aislar los compuestos mayoritarios de AcOEt.
4. Evaluar el efecto sobre la glucemia de los compuestos mayoritarios aislados.
5. Evaluar el efecto de los compuestos sobre la translocación de Glut4.
6. Evaluar el efecto de las cucurbitacinas sobre los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a la membrana plasmática.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se colectaron especímenes de la planta completa de *Ibervillea lindheimeri* para su identificación cerca de la estación Peñablanca, municipio de Peña de Miller, Querétaro, México. La colecta se realizó en tres diferentes ocasiones comprendidas entre el invierno del 2015 y el verano del 2016. Los especímenes de la planta fueron identificados por el Dr. Rafael Lira del Instituto de Biología, UNAM. El voucher de los especímenes corresponde a MEXU, 111000 del herbario del Instituto de Biología UNAM.

Aislamiento y síntesis

Aislamiento de la 23, 24-dihidrocurbitacina D (1) y de la 2-O-(β-D-glucopiranosil)-23,24-dihidrocurbitacina D (2).

La raíz de *I. lindheimeri* fue cortada en rebanadas pequeñas, secada al sol y molida. El material vegetal seco y molido fue sometido a maceración sucesiva con

hexano (Hx) anhidro, 95% Sigma-Aldrich; acetato de etilo (AcOEt) anhidro, 99.8% Sigma-Aldrich y metanol (MeOH) anhidro, 99.8% Sigma-Aldrich. La destilación (evaporación) de los disolventes a presión reducida y a temperatura de 60°C en un rotavapor Buchi produjo los respectivos extractos. Los compuestos mayoritarios del AcOEt fueron aislados utilizando el método de cromatografía por columna abierta (CCA) utilizando sílice-gel como soporte y eluída con mezclas de disolventes de polaridad creciente. De las fracciones eluídas con Hx:AcOEt (1:1) se aisló un sólido. La purificación de este sólido mediante un proceso de recromatografía por CCA en las mismas condiciones utilizadas previamente, permitió el aislamiento de la 23, 24-dihidrocucurbitacina D (1). De las fracciones eluídas con una mezcla AcOEt:MeOH (9:1) de la columna inicial se aisló un precipitado el cual se purificó mediante una recromatografía como se describió anteriormente, aislándose la 2-O-(β-D-glucopiranosil)-23,24-dihidrocucurbitacina D (2). La identificación de 1 y 2 se logró por el análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con los publicados previamente⁹.

Síntesis de la 2,16-diacetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (3) y la 2-O-β (2', 3', 4',6' tetra acetil) glucopiranosil-16 acetil-23,24-dihidrocucurbitacina D (4)

Las cucurbitacinas 1 y 2 se acetilaron en reacciones por separado en presencia de piridina y anhídrido acético a 60° C por 6 horas. Después de ese tiempo se añadió agua y se extrajeron con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una solución de HCl al 10% y después con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Los productos de estas reacciones se purificaron por CCA. Obteniéndose la 2,16-diacetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (3) y la 2-O-β (2', 3', 4',6' tetra acetil) glucopiranosil-16 acetil-23,24-dihidrocucurbitacina D (4) respectivamente. La identificación de los compuestos se logró mediante el análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con los datos publicados para estos compuestos (Ver Anexos).

Animales experimentales

Inicialmente se utilizaron ratas Wistar macho de 200-210 g para la evaluación del efecto sobre la glicemia del AcOEt. Los animales fueron comprados en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Posteriormente, para la evaluación de la actividad de las cucurbitacinas 1-4 se utilizaron ratones CD1 macho de 20-25 g; los ratones fueron comprados en el Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo y del bioterio de la Unidad de Biomedicina (UBIMED), FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el bioterio de FES-Iztacala. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron diseñados para minimizar el sufrimiento y el número de sujetos utilizados. Estos estudios se realizaron de acuerdo con los estándares éticos aprobados y realizados bajo estricto apego a los lineamientos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio adoptados por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., y el Reglamento Mexicano de Cuidado y Mantenimiento Animal (NOM-062ZOO -1999, 2001). Este procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética de FES-Iztacala y el IFC, UNAM. Utilizamos dos modelos diferentes para la evaluación del efecto de AcOEt y de las cucurbitacinas 1-4 sobre la glucemia debido a la poca cantidad obtenida de compuestos aislados.

Inducción química de diabetes

Ratas Wistar

La diabetes se indujo en 20 ratas seleccionadas al azar de un total de 30 individuos y se formaron grupos de cinco especímenes. Se privó de alimento a los animales por 12 horas previa a la administración de una dosis única de 40 mg/kg de estreptozotocina (STZ) en la vena de la cola. La STZ fue preparada en amortiguador de acetato ($C_2H_3NaO_2$, 0.10 M $C_2H_4O_2$, pH 4.5) 24 horas previa a su administración. Se monitoreo la glucemia cinco días después de la administración de STZ. Los individuos con una glucemia ≥ 200 mg/dL se consideran diabéticos.

Ratones CD1

La diabetes se indujo en 18 ratones seleccionados al azar de un total de 32 individuos. Se privó de alimento a los animales por 12 horas previa a la administración de una dosis única de 125 mg/kg de STZ intraperitoneal (ip). La STZ se preparó al momento en amortiguador de citrato ($C_6H_8O_7$ 0.10 M $C_6H_9Na_3O_9$, pH 4.5) fresco. Los ratones con una glucemia de ≥ 200 mg/dL se consideraron diabéticos.

Medición de glucemia y curva de tolerancia a glucosa

El AcOEt se evaluó de manera aguda para determinar su actividad sobre la glucemia en ratas Wistar macho. Las ratas fueron divididas en grupos de cinco individuos como se describe en la Tabla A. Las dosis fueron administradas vía intraperitoneal (ip) en solución salina con 0.1% de tween 20 como vehículo. Los niveles de glucosa se tomaron a los tiempos 0 (previo a la administración de tratamiento), 15 min, 30 min, 60 min y 120 min *post* administración. La concentración de glucosa en sangre se midió tomando muestras de sangre de la cola de la rata. Se utilizó un glucómetro Accutrend GC (Roche).

Tabla A. Tratamientos y grupos experimentales utilizados para evaluar la actividad sobre la glucemia de AcOEt. RND=ratas no diabéticas. RD=ratas diabéticas.

Grupo	Individuos y tratamiento	n
1	RND + vehículo	5
2	RND +AcOEt [500 mg/kg]	
3	RD +vehículo	
4	RD + AcOEt [500 mg/kg]	
5	RD + AcOEt [250 mg/kg]	
6	RD +metformina [500 mg/kg]	

Las cucurbitacinas 1-4 se evaluaron de manera aguda para determinar su efecto sobre la glucemia en ratones CD1 con 10-12 horas de ayuno. Los ratones fueron divididos en grupos de 3 individuos y tratados como se describe en la tabla B. Las dosis fueron administradas oralmente utilizando solución salina más 0.1% de Tween 20 como vehículo. El nivel de glucosa se midió al tiempo 0 (previo a la administración de tratamientos); pasados 30 minutos (min) de la administración del tratamiento se les administró oralmente una solución de glucosa [1.5 g/kg]. La glucemia se midió a los tiempos 15 min, 30 min, 60 min y 120 min posteriores a la ingesta de glucosa. Para

determinar la glucemia se tomaron muestras de sangre de la cola del ratón.

Utilizamos un glucómetro Accutrend GC (Roche) para medir la glucosa sanguínea.

Tabla B. Tratamientos y grupos experimentales utilizados para evaluar la actividad de 1-4 sobre la glucemia. Ratones no diabéticos (MND), ratones diabéticos (MD), vehículo=solución salina +0.1% tween 20, 23,24 dihidrocucurbitacina D (1), 2-O-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D (2), 2, 1616 acetil, 23, 24 dihidrocucurbitacina D (3), 2-O-β (2',3',4',6', tetracetil) glucopiranosil, 16 acetil, 23, 24 dihidrocucurbitacina D (4).

Individuos y tratamiento	n	Individuos y tratamiento
MND + vehículo		MD + vehículo
MND + 1 [83 mg/kg]		MD + 1 [83 mg/kg]
MND + 3 [500 mg/kg]	3	MD + 3 [500 mg/kg]
MND + 2 [500 mg/kg]		MD + 2 [500 mg/kg]
MND + 4 [500 mg/kg]		MD + 4 [500 mg/kg]
MND + metformina [500 mg/kg]		MD + metformina [500 mg/kg]

Establecimiento del efecto de los compuestos sobre la translocación de Glut4

Imunohistoquímica

Se evaluó el efecto de los compuestos 1, 2 y 4 sobre la translocación de Glut4 a la membrana plasmática (MP) en tejido muscular (músculo sóleo) y tejido adiposo (epidídimo). Los compuestos evaluados fueron seleccionados tomando en cuenta los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a glucosa. Nuevamente, se utilizaron ratones CD1 macho de 20-25 g a los que se les indujo diabetes con 125 mg/kg de STZ. Se monitoreó la glucosa por 2 semanas considerándose como diabéticos los individuos que presentaron una glucosa superior a 200 mg/dl. Al igual que con la prueba de tolerancia a glucosa anterior, se administraron los tratamientos (Tabla C) 30 min antes de la administración de 1.5 g/kg de glucosa oral.

Tabla C. Tratamientos y dosis utilizados en la evaluación de la translocación del Glut4 a la membrana plasmática. Ratones no diabéticos (MND), ratones diabéticos (MD), vehículo=solución salina +0.1% tween 20, 23,24 dihidrocucurbitacina D (1), 2-O-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D (2), 2-O-β (2',3',4',6', tetracetil) glucopiranosil, 16 acetil, 23, 24 dihidrocucurbitacina D (4).

Individuos y tratamiento	n	Individuos y tratamiento
MND + vehículo		MD + vehículo
MND+ 1 [48 mg/kg]		MD+ 1 [83 mg/kg]
MND+ 2 [500mg/kg]	3	MD+ 2 [500mg/kg]
MND+ 4 [500 mg/kg]		MD+ 4 [500mg/kg]
MND + metformina [500mg/kg]		MD + metformina [500mg/kg]

Los ratones fueron sacrificados 30 min posterior a la administración de glucosa, de acuerdo con lo observado en la curva de tolerancia a la glucosa. Se extrajeron el músculo sóleo y el tejido adiposo epidídimal los cuales fueron fijados con formalina 15% de 18-24 h y posteriormente incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 micras de tejido en los que se determinó la presencia de Glut4 utilizando un anticuerpo para la fracción extracelular de este transportador.

La cantidad de Glut4 [reacción diaminobencidina-HRP (Horse Radish Peroxidase)] se determinó de manera semicuantitativa utilizando la versión "FIJI" del software Image J con el método reportado por Fuhrich, 2013. En breve; la escala global del análisis de imagen fue de 3.91 píxeles = 1 μm con una proporción de píxeles de 1. Se utilizó el macro de balance de blancos escrito por Vytas Bindokas; Oct 2006, Univ. de Chicago, modificado por Patrice Mascalchi y se ajustó la imagen utilizando el comando "subtract background". La selección de áreas de interés (ROI) correspondientes a los tejidos se realizó utilizando la herramienta "Brush". El área digitalizada fue sometida al plug-in "color deconvolution" utilizando el vector HDAB³⁵. La intensidad final de DAB se calculó con la fórmula $f = 255 - i$, donde f = intensidad final de DAB, i = intensidad media de DAB obtenida del software.

Establecimiento del efecto de los compuestos en los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a membrana plasmática

Extracción de proteína

Los ratones CD1 fueron sacrificados 30 min después de la administración de glucosa, como se describió previamente. El músculo sóleo y el tejido adiposo epidídimal fueron extraídos como se describió previamente. Ambos tejidos fueron criopreservados en nitrógeno y almacenados a -70 °C hasta su uso. Para la extracción proteica se utilizó el protocolo descrito por Yamamoto (2016), el cual permite obtener una fracción con proteínas de membrana y la fracción de proteína total utilizando gradientes de detergentes y lavados con microcentrifuga. En breve: 1) Homogeneización del tejido con un amortiguador con baja concentración de detergente (50 mM Tris·HCl, pH 8.0, 0.00004% mercaptoetanol (BioRad), coctel inhibidor de proteasa (c0mplete, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), coctel inhibidor de fosfatasa

(PhosStop, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 0.1% NP-40(IGEPAL*CA-630, Sigma-Aldrich); 2) remoción de células no lisadas mediante una centrifugación de baja velocidad (200 g, 1 min); 3) aislamiento de partículas de membrana del sobrenadante por centrifugación (750 g, 10 min); 4)lavado de las partículas de membrana con un amortiguador con alta concentración de detergente (1.0% NP-40). La proteína total se obtuvo con amortiguador RIPA (300 mM NaCl, 20 mM Tris·HCl, pH 8.0 2% (v/v) NP-40, cóctel inhibidor de proteasas, coctel inhibidor de fosfatasas, 0.2% (w/v) SDS (Wako Pure Chemical, cat. no. 192-14042) y 0.00008% mercaptoetanol)³⁶. La solución de proteína se usó inmediatamente y/o se preservó a -70 °C hasta su uso.

Western Blot

La proteína (7.5 µg/ml) se resolvió en un gel de dodecil sulfato poliacrilamida 10% (SDS-page) y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron anticuerpos primarios: pAMPK, AMPK, pAKT, AKT y Glut4; se utilizó un anticuerpo secundario contra conejo como anticuerpo secundario. Como control de carga se utilizó GAPDH²⁷.

Prueba de tolerancia a piruvato

Los compuestos 1, 2 y 4 se evaluaron de manera aguda para determinar su efecto sobre la producción de glucosa a partir de piruvato en ratones CD1 con 10-12 h de ayuno. Los ratones fueron divididos en grupos y tratados como se describe en la Tabla D. Los compuestos fueron administrados oralmente utilizando solución salina más 0.1% de tween 20 como vehículo. La glucemia se midió al tiempo 0 (previo a la administración de tratamientos); pasados 30 min de la administración del tratamiento se les administró por vía intraperitoneal (ip) una solución de piruvato de sodio [2 g/kg] (Sigma Aldrich). Adicionalmente, se midió glucosa a los tiempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min posteriores a la administración de piruvato. Para determinar la glicemia se tomaron muestras de sangre de la cola del ratón. Utilizamos un glucómetro Accutrend GC (Roche) para medir la glucosa sanguínea.

Tabla D. Tratamientos y grupos experimentales utilizados para evaluar la actividad de 1, 2 y 4 sobre gluconeogénesis (producción de glucosa a partir de piruvato). Ratones no diabéticos (MND), ratones diabéticos (MD), vehículo=solución salina +0.1%tween 20, 23,24 dihidrocucurbitacina D (1), 2-O-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D (2), 2-O-β (2',3',4',6', tetracetil) glucopiranosil, 16 acetil, 23, 24 dihidrocucurbitacina D (4).

Individuos y tratamiento	n	Individuos y tratamiento	n
MND + vehículo		MD +vehículo	
MND+ 1 [83 mg/kg]		MD+ 1 [83 mg/kg]	
MND+ 2 [500 mg/kg]	3	MD+ 2 [500 mg/kg]	3
MND+ 4 [500 mg/kg]		MD+ 4 [500 mg/kg]	
MND + metformina[500 mg/kg]		MD + metformina [500 mg/kg]	

Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7 para Windows. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA de una vía; los valores de $P \leq 0.05$ se consideraron como significativos.

Acoplamiento molecular

Los datos sobre la estructura de las proteínas AMPK de rata y AKT2 humanas se obtuvieron del Protein Data Bank [números de acceso AMPK (5UFU) y AKT2 (3E8D)]. El modelo tridimensional de 1 se obtuvo de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>), mientras que los modelos estructurales de los compuestos 2 y 4 se generaron con el software Maestro, Ver. 11.9 (Schrodinger, LLC, Nueva York, NY, EE. UU.). Para el análisis de acoplamiento, los inhibidores N- [2- (5-metil-4H-1,2,4-triazol-3-il) fenil] -7H-pirroló [2,3-d] pirimidin-4-amina y 4 - [2- (4-amino-2,5-dihidro-1,2,5-oxadiazol-3-il) -6 - {[(1S) -3-amino-1-fenilpropil] oxi} -1-etilo -1H-imidazo [4,5-c] piridin-4-il] -2-metilbut-3-in-2-ol de AKT2 y el agonista AMP de AMPK se eliminaron del sitio de unión usando el software UCSF Chimera Ver. 1,13,1 (desarrollado por Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics en la Universidad de California, San Francisco, con el apoyo de NIH P41-GM103311)³⁷. Las estructuras de proteína y ligando se prepararon para el acoplamiento usando el software ADT 1.5.2.³⁸. El análisis de acoplamiento se realizó utilizando el software AutoDock 4.2.5.1 (disponible en <http://autodock.scripps.edu/>)³⁸. Después del acoplamiento, se obtuvieron cien conformaciones de cada compuesto y luego se agruparon para su análisis usando el

software ADT 1.5.2. Las conformaciones seleccionadas estaban dentro del grupo más representado y correspondían a las que mostraban los valores más bajos de energía de unión y K_i . Los análisis de modelos y dibujos de figuras se llevaron a cabo con PYMOL 2.1.0 (The PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.1.0 Schrödinger, LLC; <https://sourceforge.net/p/pymol>).

Resultados y Discusión

Extracción, aislamiento y síntesis

Se colectaron tres muestras diferentes de raíz de *I. lindheimeri* y procesadas como se describió previamente para obtener un total de 84.37 g de extracto de AcOEt correspondiente al $1.14 \pm 0.48\%$ del peso seco de la raíz ().

Tabla E). Una proporción similar a la reportada por Figueroa (2014).

Tabla E. Rendimientos de extractos a partir de las colectas de raíz de *I. lindheimeri*. PH=peso húmedo, PS= peso seco, Ext Hx= gramos de extracto de Hx obtenidos, Ext. MeOH=gramos de extracto de MeOH obtenidos, Ext. AcOEt=gramos de extracto de AcOEt obtenidos, % de Ext AcOEt=porcentaje del peso seco correspondiente al extracto de AcOEt (calculado como el promedio de la igualdad de razones $PS/Ext\ AcOEt = \% PS / \% de\ Ext\ AcOEt$ de las tres colectas \pm desviación estándar de las tres colectas).

PH [g]	PS [g]	Ext. Hx [g]	Ext. MeOH [g]	Ext. AcOEt [g]	% de Ext. AcOEt
4990.0	789.0	8.0	64.0	12.9	
14359.3	3360.0	26.4	184.0	22.5	1.14 ± 0.48
25680.0	4333.0	21.3	328.0	49.0	
45,029.3	8,482.0	55.7	576.0	84.37	

Las cucurbitacinas 23, 24-dihidrocucurbitacina D (1) y de la 2-O-(β -D-glucopiranosil)-23,24-dihidrocucurbitacina D (2) se aislaron del extracto de AcOEt mediante cromatografía en columna abierta (CCA) como se describió en la sección de métodos. El rendimiento de la cucurbitacina 1 fue del $4.07 \pm 0.74\%$ a partir de AcOEt, mientras que la cucurbitacina 2 se aisló con un rendimiento del $18.32 \pm 6.94\%$ a partir de AcOEt (Tabla F).

Para facilitar el aislamiento de las cucurbitacinas y comenzar a estudiar la relación estructura/función se sintetizaron productos acetilados como se describió

previamente. El producto de acetilación de 1 se identificó como 2,16 di acetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (3) y el producto de acetilación de 2 se identificó como (2,3,4,6, tetracetil)2-O-β glucopiranosil, 16 acetil, 23, 24-dihidrocucurbitacina (4). Ambos productos sufrieron acetilaciones en los sustituyentes de la posición 2, la cual ha sido reportada por su importancia en la función biológica de las cucurbitacinas^{20,22,39,40}.

Tabla F. Rendimiento de compuestos aislados a partir del extracto de AcOEt de la raíz de *I. lindheimeri*. Ext AcOEt= gramos de extracto de AcOEt obtenidos, % de Ext AcOEt= porcentaje del peso seco correspondiente al extracto de AcOEt. 1 peso de la 23, 24-dihidrocucurbitacina D (1) del conjunto de fracciones eluidas con 1:1 (Hx:AcOEt). 2 peso en gramos de la 2-O-(β-D-glucopiranosil)-23,24-dihidrocucurbitacina D (2) del conjunto de fracciones eluidas con 9:1 (AcOEt:MeOH). 1%= % peso en gramos de 1 a partir del extracto de AcOET. 2%= % peso en gramos de 2 a partir del extracto de AcOET.

Ext AcOEt [g]	% de Ext AcOEt	1 [g]	2 [g]	1%	2%
12.87		0.47	2.35		
22.50	1.14 ±0.48	1.11	2.57	4.07±0.74	18.32±6.94
49.00		1.78	12.40		
84.37		3.36	17.32		

La identificación de 1-4 se realizó mediante el análisis de sus espectros monodimensional y bidimensional de RMN ¹H y ¹³C. Así como mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los datos previamente reportados (ver Anexos) ^{41,42}.

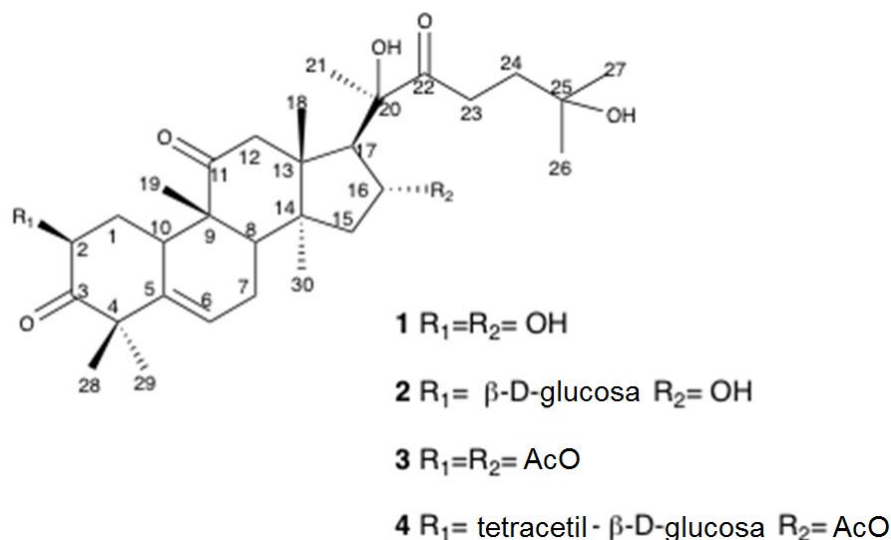


Figura 3. Estructura química de los triterpenos cucurbitanos aislados del extracto de AcOEt de *I. lindheimeri*. **1**=23,24-dihidrocucurbitacina D, **3**= 2,16-diacetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D y derivados acetilados, **2**=2-O- β glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D y **4**=2-O- β (2', 3', 4',6' tetra acetil) glucopiranosil-16 acetil-23,24-dihidrocucurbitacina D.

Un hecho interesante a resaltar es que a pesar de que la proporción del extracto de AcOEt respecto al peso seco no cambió durante las colectas, la cantidad de **2** sí varió entre los meses de colecta. Esto podría ser debido a las distintas condiciones de estrés a lo largo de los meses de colecta, como fueron: sequías, ataque de depredadores y/o parásitos, o a que en la segunda colecta el estado de desarrollo del individuo era mayor que los colectados en fechas anteriores. Las diferencias en las temporadas de colecta podrían también explicar por qué el aislamiento del tercer compuesto de *I. lindheimeri* descrito, la 23, 24-dihidrocucurbitacina F, no se logró, ya que los metabolitos secundarios están involucrados fuertemente en la manera en como las plantas interactúan con su ecosistema. Se han descrito como antibióticos y antifúngicos además de prevenir el daño causado por la luz UV al follaje⁴; en particular, las cucurbitacinas han sido descritas por su rol en la resistencia al ataque de plagas, donde se ha sugerido una relación cuantitativa entre la producción de estos triterpenos y la resistencia a los insectos^{43,44}. Sin embargo, hasta el momento no existe un estudio de metabolómica o de la producción de metabolitos secundarios de esta especie que permitan contestar si fueron factores de estrés ecológico los que ocasionan la diferencia en la síntesis de estos metabolitos.

Adicionalmente se aislaron dos nuevos compuestos no reportados en esta especie a partir del extracto de AcOEt: el acetato natural de 1; 2,16-diacetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (**3**) y la cucurbitacina L. El diacetato natural también se aisló del extracto AcOEt de la raíz de *I. lindheimeri*; al igual que su equivalente sintético este compuesto eluye en una polaridad de 6:4 Hexano:AcOEt, representa el 0.03% del peso seco total de la raíz y el 1.8% del extracto de AcOEt. Este fue identificado al analizar y comparar sus datos espectroscópicos contra los reportados previamente. El compuesto empleado en las evaluaciones fue el sintetizado a partir de 1 mediante una reacción de acetilación descrita en la sección de métodos.

La cucurbitacina L (CL), se diferencia de las cucurbitacinas previamente aisladas al presentar un segundo doble enlace entre las posiciones C-1 y C-2 además de un grupo hidroxilo en la posición C-24 (

Figura 4). CL fue aislada de una placa preparativa donde también se aisló la cucurbitacina 1. Esta placa fue eluída con 7:1 AcOEt:Hx presento 2 bandas, siendo la banda minoritaria y de mayor polaridad la CL; fue identificada al analizar y comparar sus datos espectroscópicos contra los reportados en la literatura.

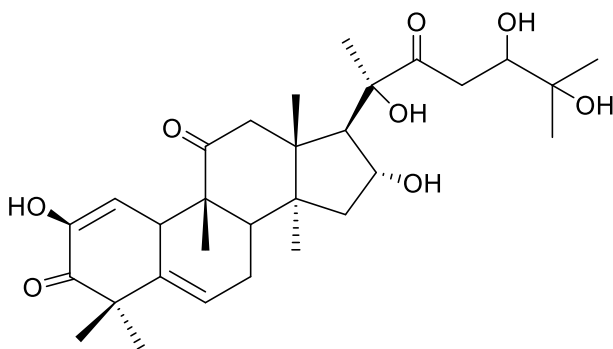


Figura 4. Estructura química de la cucurbitacina L aislada del extracto de AcOEt de *I. lindheimeri*. (9*R*, 13*R*, 14*S*, 16*R*, 17*R*)-17-(2, 6-dihidroxi-5, 6-dimetil-3-oxoheptano-2-yl)-2,16-dihidroxi-4,4,9,13,14-pentametil-7,8,9,10,12,13,14,15,16,17-decahidro-3*H*-ciclopenta[*a*] fenantreno-3,11 (4*H*)-diona. Formula química: C₃₁H₄₆O₇. Peso molecular: 530.32

Establecimiento del efecto sobre la glucemia del extracto de AcOEt en un modelo de diabetes

Para evaluar el efecto sobre la glucemia del extracto de AcOEt de *I. lindheimeri* se utilizaron ratas Wistar macho químicamente diabetizadas y divididas en seis grupos. Los resultados muestran que la dosis de 500 mg/kg, pero no la de 250 mg/kg disminuyó la glucemia de manera estadísticamente significativa comparada con el control de ratas diabéticas más vehículo (RD+V). Por otro lado, los animales de los grupos RD+V y de ratas diabéticas más 250mg/kg de AcOEt (RD+AcOEt. 250mg/kg) tuvieron valores de glucemia estadísticamente diferentes del control de ratas no diabéticas más vehículo (RND+V) (ANOVA, Bonferroni $P \leq 0.001$ y $P \leq 0.0001$).

De manera interesante, la dosis de 500mg/kg no disminuyó la glucemia en ratas no diabéticas (RND) lo que sugiere una actividad anti-hiperglucemiante; siendo necesaria esta dosis para observar este efecto en RD. Este efecto ha sido reportado para metformina, cucurbitacinas y AICAR, un activador de la AMPK lo que indica un mecanismo independiente de insulina ^{10,12,45-48}.

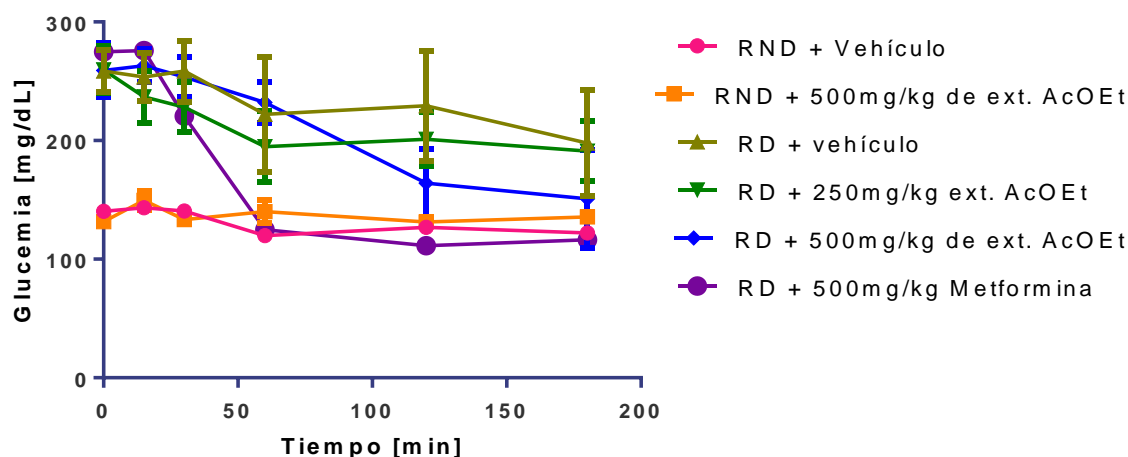


Figura 5. Efecto sobre la glucemia del extracto de acetato de etilo de la raíz de *I. lindheimeri*. A) Curva de tolerancia a la glucosa de los grupos sometidos a tratamiento. RND= Ratas no diabéticas, RD= ratas diabéticas; ext. AcOEt= extracto de AcOEt de *I. lindheimeri*. * diferencia significativa $P \leq 0.05$. Se muestra $n=5 \pm EEM$.

Evaluación del efecto sobre la glucemia de las cucurbitacinas 1-4

Para evaluar el efecto de las cucurbitacinas 1 y 2 y sus derivados acetilados 3 y 4 sobre la glucemia se utilizaron ratones CD1 macho químicamente diabetizados como se describió previamente. Tomando en consideración que las dosis de extracto utilizadas en el estudio no provocaban hipoglucemias ni tenían ningún efecto tóxico aparente, se decidió utilizar la dosis de 500 mg/kg en las pruebas de actividad de los compuestos. Sin embargo, el compuesto 1 demostró ser demasiado potente causando hipoglucemias letales en los animales de estudio, por lo que se realizó una curva de dosis respuesta para este compuesto en ratones CD1 no diabéticos (NDM) (Figura 6). Con esta curva se calculó 48mg/kg como la dosis efectiva 50 (DE₅₀) la cual fue empleada en las pruebas con los NDM. La dosis de 48mg/kg no disminuyó la glucemia en los ratones diabéticos (DM) por lo que se decidió emplear la dosis de 83mg/kg que ya había sido evaluada en la curva dosis respuesta y que provocaba un efecto hipoglucemiante no letal en los ratones.

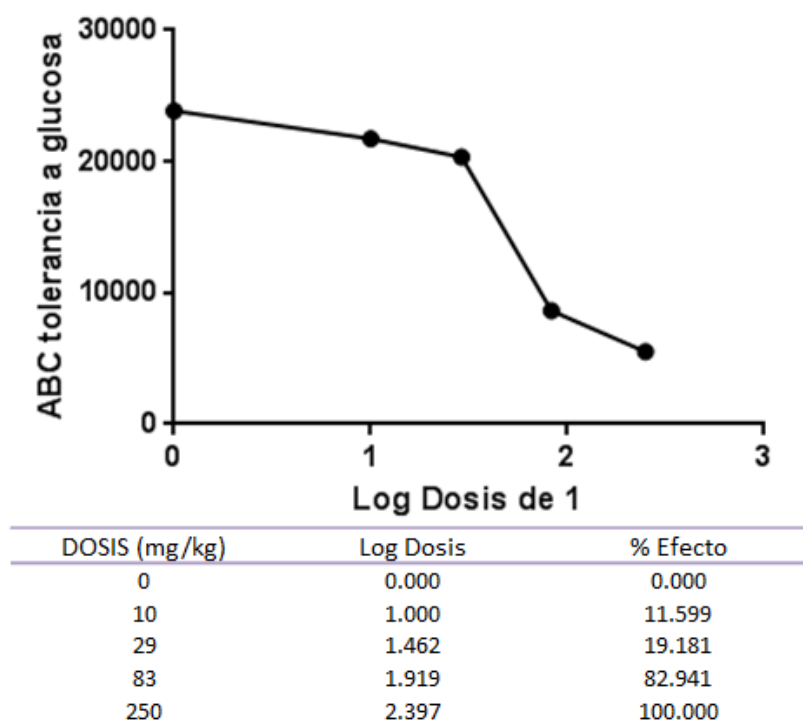


Figura 6. Curva dosis respuesta de 1 en el grupo NDM. ABC=Área bajo la curva de tolerancia a glucosa como expresión integrada de la glucemia.

Los resultados muestran que 1 disminuyó la concentración de glucosa en sangre en NDM y DM a las dosis 48 mg/kg y 83 mg/kg respectivamente. La glicemia fue estadísticamente diferente de DM ($P \leq 0.001$) y similar a MND. Los otros 3 compuestos no disminuyeron la glicemia en NDM (estadísticamente similar a NDM + Vehículo). En ratones diabéticos solo 2 [500 mg/kg] y 4 [500mg/kg] mostraron diferencias significativas contra DM ($P \leq 0.05$, y 0.001 respectivamente) y no diferente a NDM. A pesar de que 3 disminuyó la glucemia no mostró diferencia significativa contra el control DM + Vehículo.

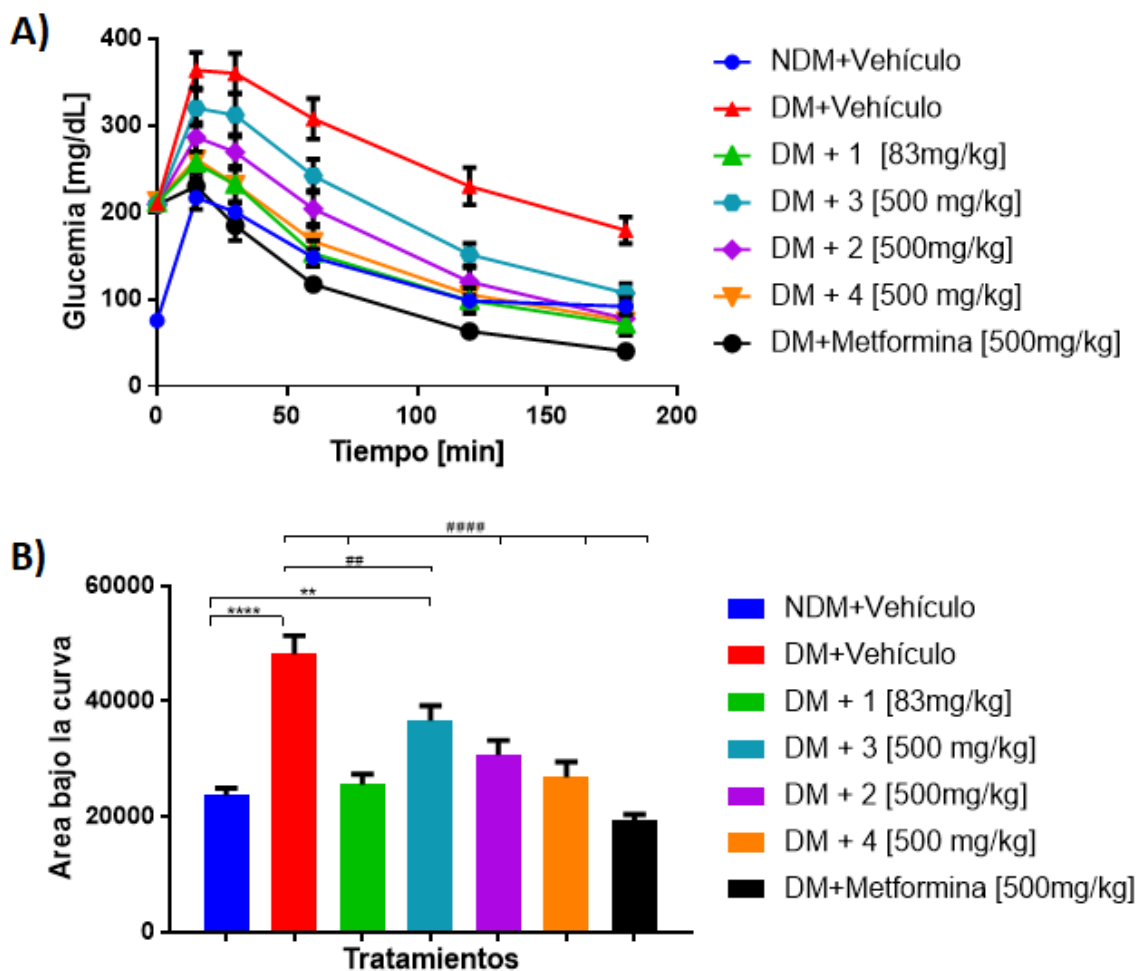


Figura 7. Efecto sobre la glucemia de las cucurbitacinas 1-4. A) Curva de tolerancia a glucosa. B) Área bajo la curva de tolerancia a glucosa como expresión integrada de la concentración de glucemia. NDM= ratones CD1 no diabéticos, DM= ratones CD1 diabéticos; 1= 23,24 dihidrocucurbitacina; 3= 2,16 diacetil 23,24 dihidrocucurbitacina D; 2= 2-O-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D; 4= 2,3,4,6, tetracetil la 2-O-β glucopiranosil, 16 acetil, 23, 24 dihidrocucurbitacina D. **, ****, significativo a una $P \leq 0.01$ y 0.0001 respectivamente vs NDM+Vehículo, ##, #### significativo a una $P \leq 0.01$ y 0.0001 respectivamente vs DM+Vehículo. Se muestra $n=8 \pm$ EEM.

Las cucurbitacinas 1-4 tienen efectos muy diferentes sobre la glucemia. Los resultados muestran que 1 es el compuesto más efectivo al bajar la glucemia de manera similar a la metformina a una dosis de 83 mg/kg. Desafortunadamente causa hipoglucemias letales a dosis más altas tanto en el grupo NDM como en el DM. Por otro lado, a pesar de que el glucósido (2) y su derivado acetilado (4) tienen efecto a dosis mayores (500mg/kg) no causaron hipoglucemia o baja de glucosa en ratones no diabéticos, una característica deseable para compuestos para tratar la diabetes. Aunque el extracto de AcOEt contiene la aglicona 1 y el glucósido de cucurbitacina D 2 el efecto observado al tratar a los ratones con extracto fue antihiperoglucemiante, no hipoglucemiante. Los resultados observados pueden ser explicados debido a la presencia mayoritaria de 2 en el extracto (6 veces mayor que 1).

La naturaleza de los sustituyentes en la posición C-2 tiene una gran influencia en el efecto observado sobre la glucemia ejercido por estas cucurbitacinas y por consiguiente en su mecanismo de acción en sus tejidos blanco. Comparando los efectos sobre la glucemia de los compuestos 1 y 3, observamos que 1 fue el más activo, mientras que el compuesto diacetilado 3 fue el menos activo, aunque ambas cucurbitacinas presentaron una conformación similar de menor energía. De manera interesante la sustitución en C2 por un residuo de glucosa (glucopiranosil) en 2 y la acetilación de este residuo y del hidroxilo en C16 en 4 tienen un efecto antihiperoglucemiante. Estos resultados indican que posiblemente los sustituyentes en C2 y C16 pueden ser esenciales para la actividad biológica de estas cucurbitacinas.

Finalmente, ninguno de los grupos tratados tanto con el extracto, como con las cucurbitacinas 1-4 mostró diarrea, vomito, sangrado gastrointestinal, hipotensión o irritación de las mucosas, todos los síntomas descritos por envenenamiento de cucurbitacinas⁴⁹. Más aún los animales tratados con 2 o 4 no mostraron algún síntoma de envenenamiento ni toxicidad aguda, aun cuando se usaron a dosis mucho más altas de las reportadas en ensayos previos^{20,49,50}.

Evaluación del efecto de los compuestos 1, 2 y 4 en la translocación de Glut4 a membrana plasmática de músculo sóleo y tejido adiposo epidídimal

Una vez que se determinó el efecto de las cucurbitacinas sobre la glucemia en los grupos NDM y DM (actividad hipoglucemiante para 1 y antihiperoglucemiante para 2 y 4) se procedió a establecer el mecanismo de acción. La captación de glucosa postprandial es uno de los principales mecanismos para mantener la homeostasis de glucosa en el organismo. La translocación de vesículas de Glut4 del citoplasma a membrana plasmática (MP) en tejidos blanco como el músculo esquelético y el tejido adiposo juega un papel principal en este mecanismo. Tomando lo anterior en consideración se buscó establecer el efecto de las cucurbitacinas de *I. lindheimeri* sobre la translocación *in vivo* del Glut4 a la MP (objetivo 5) utilizando músculo sóleo (MS) y tejido adiposo epidídimal (TAE) tanto de NDM como de DM.

Efecto de los compuestos en la translocación de Glut4 a la membrana plasmática de músculo sóleo

Los resultados muestran que los compuestos 1, 2 y 4 aumentan la presencia de Glut4 en la MP de MS al observarse una mayor intensidad de DAB comparado con el control DM + Vehículo. Sin embargo, solo la cucurbitacina 1 promovió la translocación de Glut4 de manera estadísticamente significativa, alcanzando una presencia de este transportador en MP similar a la del control NDM (correspondiendo al $99.70 \pm 16.87\%$ del control NDM + Vehículo) y estadísticamente diferente a DM + Vehículo ($p \leq 0.001$), (Figura 8B). Aunque 2 y 4 aumentan más de 100% la cantidad de Glut4 en la MP comparado con DM+Vehículo su cantidad es menor al observado en NDM+Vehículo ($62.37 \pm 15.96\%$ y $37.99 \pm 5.27\%$ respectivamente). No obstante, estos compuestos también reducen la glucemia en DM de manera significativa lo que sugiere que están actuando en algún otro mecanismo o tejido blanco como el tejido adiposo.

Cabe resaltar el caso del glucósido 2 el cual presenta una actividad sobre la translocación de GLUT4 (segundo lugar en actividad) significativamente similar tanto al control NDM+Vehículo como al DM+Vehículo lo que pareciera indicar una activación parcial de la ruta de señalización involucrada en la translocación de Glut4 (Figura 8B) en este tejido. Dicho efecto parcial podría explicarse por una hidrólisis parcial del

enlace glucosídico en C2 dando como producto la cucurbitacina 1⁵¹, o a una interacción en distintos sitios de unión de las proteínas blanco de este compuesto. Para tratar de llegar a una conclusión es necesario realizar estudios sobre las transformaciones y estabilidad de la 2 *in vivo*.

Efecto de los compuestos en la translocación de Glut4 a la membrana plasmática de tejido adiposo epididimal

Se evaluó el efecto de los compuestos en tejido TAE obtenido de los mismos ratones donde se tomaron las muestras de MS. Los niveles detectados de Glut4 en MP de TAE son menores comparados a los observados en MS en concordancia con lo reportado en literatura⁵² (en nuestro experimento TAE NDM+vehículo corresponde al 17% de la cantidad observada en MS NDM+vehículo). En los individuos NDM tratados con las cucurbitacinas y metformina la translocación de Glut4 fue similar al observado en el grupo NDM+Vehículo (datos no mostrados). En cambio, en los grupos de DM tratados con las cucurbitacinas 1, 2 y 4 incrementan la translocación de Glut4 de manera estadísticamente significativa comparadas con el control DM aumentando la presencia de este transportador en MP en un 222.7%±9.84 comparado con NDM+Vehículo y 494.2%±21.85 con DM+Vehículo de manera similar a la metformina.

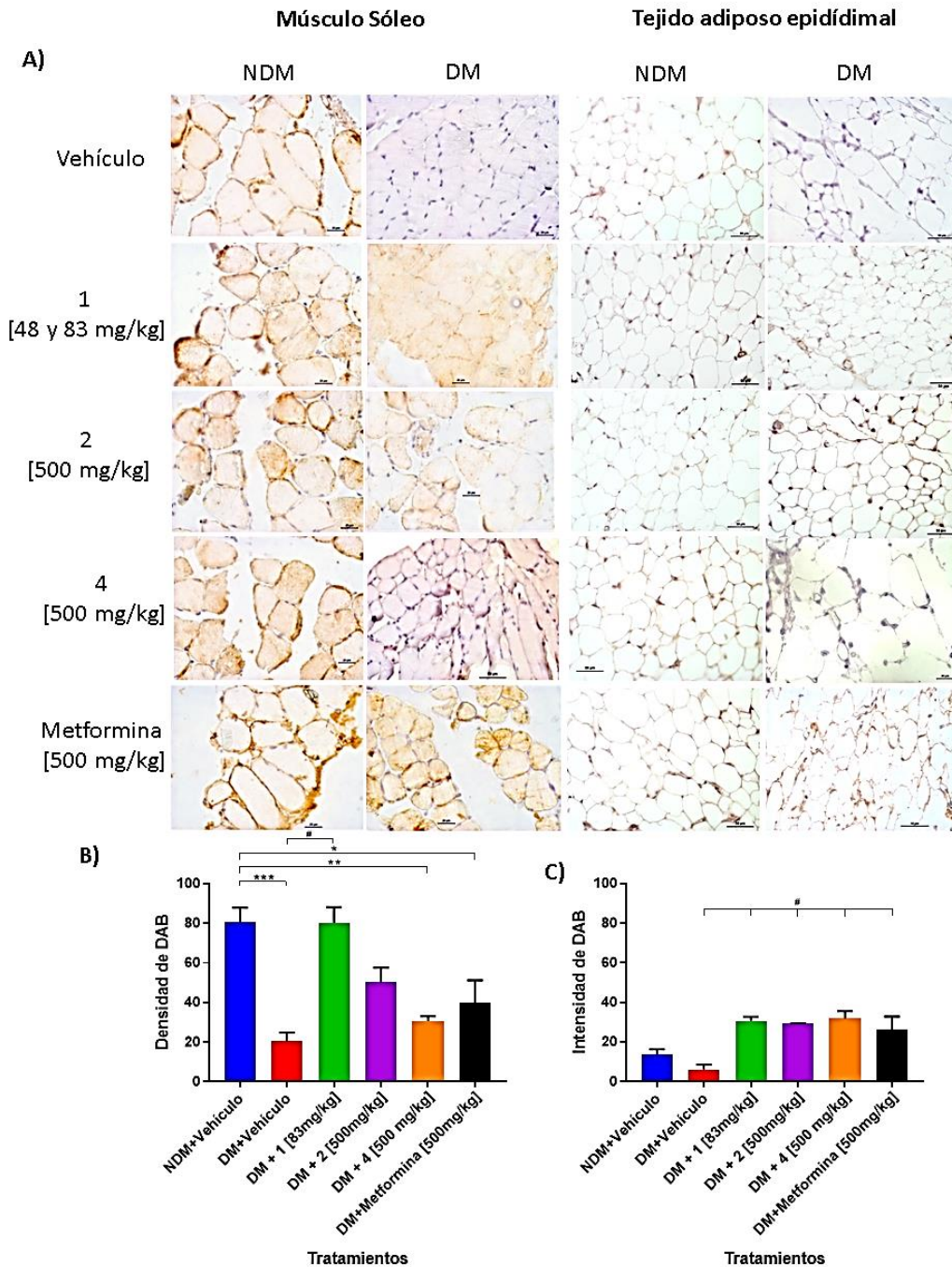


Figura 8. Efecto sobre la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) de las cucurbitacinas aisladas del extracto de ACOEt de la raíz de *I. lindheimeri*. A) Inmunohistoquímica (IHC) de GLUT4 translocado a membrana plasmática (MP) de músculo sóleo y tejido adiposo en CD1 no diabéticos (NDM) y CD1 diabéticos (DM) sometidos a tratamiento con las cucurbitacinas y metformina. B) Intensidad de diaminobencidina (DAB) como expresión de la presencia de GLUT4 en la MP de células de músculo sóleo. C) Intensidad de DAB como expresión de la presencia de GLUT4 en la MP de células de tejido adiposo epididimal. Ambas intensidades fueron calculadas utilizando el programa "Fiji" de ImageJ. NDM= ratones CD1 no diabéticos, DM= ratones CD1 diabéticos; 1= 23,24 dihidrocucurbitacina D (48mg/kg en ratones no diabéticos y 83mg/kg en ratones diabéticos); 2= 2-*O*-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D; 4= 2,3,4,6, tetracetil la 2-*O*-β glucopiranosil, 16 acetil, 23, 24 dihidrocucurbitacina D. Cada barra denota la media ± desviación estándar. # significativo a una P≤0.05 respectivamente vs DM + Vehículo; **, *** significativo a una p≤0.01 y 0.001 respectivamente vs NDM + Vehículo. Se muestra n=3 ± EEM.

Al comparar los datos obtenidos por inmunohistoquímica (Figura 8B y Figura 8C) contra la curva de tolerancia a la glucosa (Figura 4) indican que la cucurbitacina 1 ejerce su efecto hipoglucemiante al aumentar la captación de glucosa tanto en el MS como en el de TAE promoviendo la translocación de Glut4 a la MP. De manera interesante, los compuestos 2 y 4 disminuyen la glucemia de manera significativa al compararlos con el grupo DM+Vehículo(Figura 7B) mientras que la presencia de Glut4 en la MP no fue estadísticamente diferente a este control en el MS (Figura 8B). Sin embargo, se observó un incremento significativo en TAE (Figura 8C) a la dosis empleada. Estos resultados parecen indicar que el aumento en la translocación de Glut4 a MP en tejido adiposo es suficiente para contender en gran medida con la hiperglucemia en DM. Previamente se ha reportado que organismos knock-out (KO) para Glut4 en músculo dan resistencia a insulina pero también lo hacen los que son solo KO en tejido adiposo a un grado similar al KO de músculo, aun cuando el músculo capta aproximadamente el 70% de la glucosa postprandial contra el 10% aproximado del tejido adiposo⁵³. Estos resultados sugieren que el tejido TAE es muy importante para la homeostasis de glucosa en un organismo. El compuesto 1 fue el único capaz de promover la translocación de Glut4 a MP tanto en TAE como en MS de manera significativa y siendo este último el principal aceptor de glucosa postprandial explicaría el efecto hipoglucemiante presentado por esta cucurbitacina. Teniendo en cuenta el comportamiento observado, los compuestos que promueven la eliminación de glucosa por el tejido adiposo, como las cucurbitacinas de *I. lindheimeri*, son ideales para el tratamiento de la diabetes *mellitus* al reducir la glucosa en sangre en personas diabéticas de forma segura y sin causar hipoglucemia.

Evaluar el efecto de 1, 2 y 4 en los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a MP en MS y TAE

Se ha determinado experimentalmente que las vías AMPK y AKT son los principales controladores de la translocación de Glut4 en el tejido muscular y adiposo⁵⁴. Para investigar el mecanismo de acción responsable de la estimulación de la translocación de Glut4 por las cucurbitacinas, examinamos sus efectos sobre estas rutas mediante la técnica de Western Blot como se describió previamente.

Efecto de las cucurbitacinas en los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a membrana plasmática en tejido adiposo

Los resultados indican una mayor expresión de proteínas (segundos mensajeros) en tejido adiposo comparado con MS (Figura 9F). Además se observa que bajo las condiciones de este estudio tanto la AMPK como AKT se encuentran activas en el control NDM; comportamiento descrito para tejido adiposo donde AMPK es capaz de controlar la activación de AKT por la vía de mTOR⁵⁵ (Figura 9G y Figura 9I). En TAE, la activación de la enzima AKT se observó en los grupos tratados con 1, 2 y metformina, similar al grupo NDM+vehículo; sin embargo, la expresión total de esta enzima fue diferente en cada grupo tratado.

Adicionalmente, se observó un aumento en pAMPK en los grupos tratados con 1, 4 y metformina en comparación con DM + Vehículo; la cantidad de pAMPK fue similar a la observada en el control NDM (Figura 9G) pero la expresión total de esta enzima fue diferente en cada grupo tratado (Figura 9H). La activación de la vía parece depender de la cantidad de enzima activada independientemente de la proteína total expresada. Los compuestos 1, 4 y metformina activan AMPK de manera similar, lo que sugiere que las dosis utilizadas pueden inducir la activación de una cierta cantidad de enzima independientemente de la enzima total disponible. En nuestros experimentos observamos variaciones entre la expresión de proteínas, las cucurbitacinas 1, 2 y 4 parecen ser capaces de modificar la expresión de AMPK y AKT en TAE. No obstante, se desconoce cómo los compuestos influyen la expresión de estas enzimas.

Aunque el compuesto 4 no causó un aumento de la fosforilación de AKT (Figura 6I), sí promovió la activación de AMPK, la translocación de la membrana Glut4 y la reducción de la hiperglucemia. Estos resultados, junto con la activación relativa de AMPK (Figura 9G), junto con la inhibición de la activación de AKT (**Figura 9I**) en el grupo DM, sugieren que en TAE, la vía AMPK y no la vía AKT es la principal responsable del aumento en translocación de Glut4 a MP en diabéticos tratados con cucurbitacinas 1, 2 y 4. La no activación de AKT por el compuesto 4 puede significar que las cucurbitacinas de *I. lindheimeri* están activando AMPK y AKT de manera independiente en este tejido. Esta propuesta se ve apoyada por el hecho de que 4 tiene una conformación diferente a las cucurbitacinas 1-3. Sin embargo, el modelo de diabetes que utilizamos, interrumpe

la vía de señalización de la insulina⁵⁶, por lo que la falta de activación podría estar más relacionada con 4 no regulando positivamente la vía de señalización de AKT, que interactuar independientemente con ella. Por otro lado, la no activación de AKT se asemeja más al comportamiento observado en SM que puede explicarse por la estructura de la cucurbitacina y cómo interactúa y activa AMPK. Se requieren más estudios para corroborar estas hipótesis.

El tratamiento con cucurbitacina 2 tuvo la menor cantidad de pAMPK, aunque aumenta el pAMPK en comparación con DM + Vehículo también tenía la expresión total más baja y AMPK. Sin embargo, el tratamiento con este compuesto es capaz de inducir la translocación de Glut4 al mismo nivel que las otras cucurbitacinas y metformina (Figura 5C), esto podría indicar que los niveles de pAMPK alcanzados son suficientes para promover la translocación de Glut4 de manera significativa. Por otro lado, este compuesto también aumenta el pAKT en forma similar al control del vehículo NDM + (Figura 6I), por lo que la activación dual de estas vías podría ser responsable de la translocación Glut4 observada.

Efecto de las cucurbitacinas en los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4 a la membrana plasmática (MP) en músculo sóleo (MS)

Nuestros resultados demuestran que de las tres cucurbitacinas evaluadas solo la 1 promueve la fosforilación (activación) de AMPK de manera similar al compuesto control metformina de manera estadísticamente significativa en MS. Esta actividad podría explicar la inducción de la translocación de Glut4 inducida por 1, es similar a la del grupo NDM+vehículo y más alta que la del grupo DM con metformina (Figura 8B). La cucurbitacina 2 indujo la presencia de pAMPK comparable a la del grupo de control NDM, mientras que 4 mostró una mayor activación. Sin embargo, ambos fueron menos activos que la metformina (Figura 9B). Es posible que los incrementos de pAMPK inducidos por 2 y 4 no fueran suficientes para promover la translocación de Glut4 de manera significativa (Figura 8B) en MS. La expresión total de AMPK disminuyó en los grupos de DM tratados con cucurbitacinas o metformina en comparación con NDM (Figura 9C). Por otro lado, ninguno de los tratamientos con cucurbitacinas tuvieron un efecto positivo sobre la fosforilación de AKT (pAKT)(Figura 9D) en MS. Todos los

grupos mantuvieron niveles bajos similares al control DM. Si consideramos que se utilizó un modelo de diabetes inducida que interrumpe la vía de señalización de insulina la cual media la translocación de GLUT4 vía la fosforilación de AKT⁵⁶, estos resultados indican que las cucurbitacinas empleadas en este estudio no ejercen su efecto activando a esta enzima, pero sí activan AMPK en ausencia de insulina en el músculo. Además, se ha informado que la activación de AMPK inhibe la activación de AKT en este tejido^{57,58}.

La administración de 1 parece promover la expresión de AKT o acumulación de AKT (Figura 9D). Esto podría deberse a la activación de AMPK la cual tiene un efecto inhibitorio sobre el receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma (PPAR α) el cual a su vez regula la expresión de AKT⁵⁹. Sin embargo, este efecto no se observa con metformina el cual es también un activador de AMPK lo que podría indicar que este efecto se debe a un mecanismo distinto, o bien, a la activación directa de la transcripción.

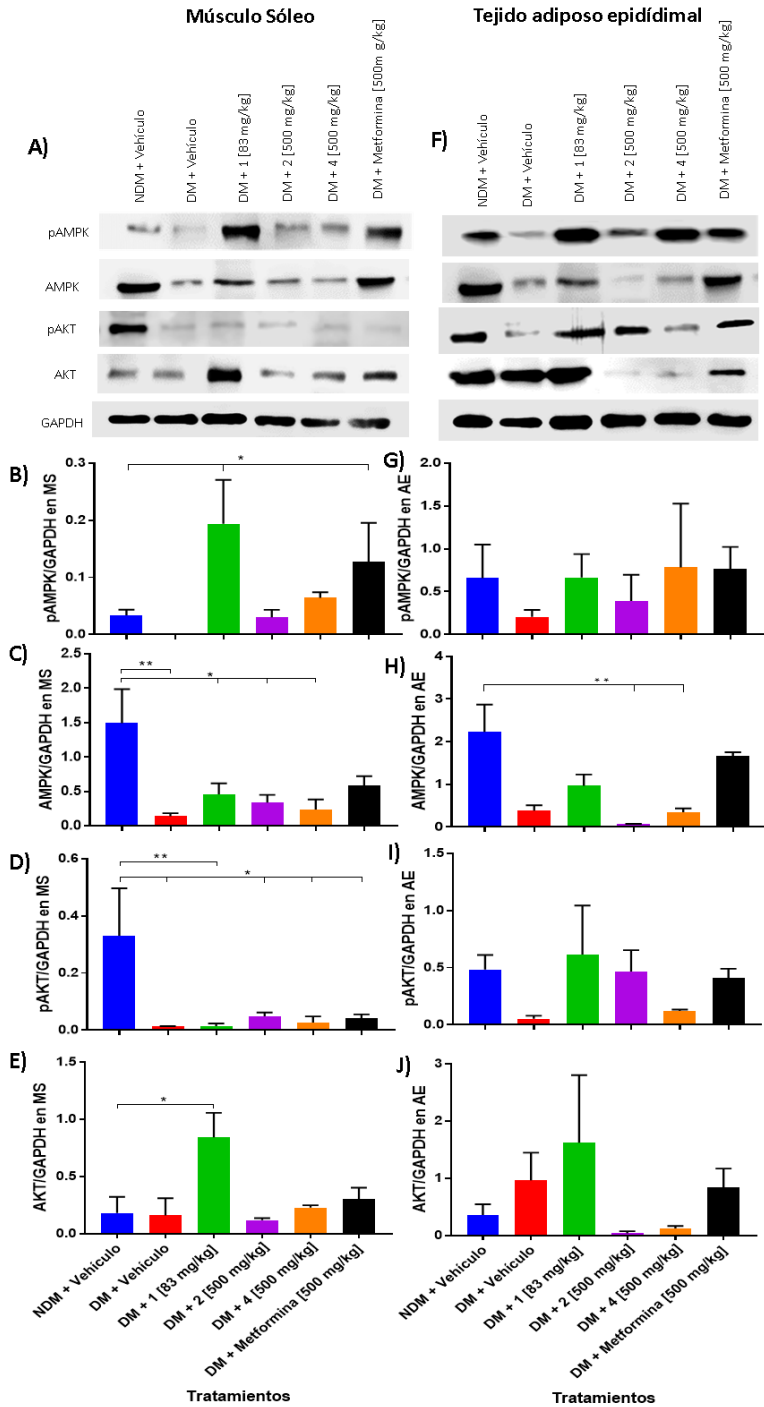


Figura 9. Determinación del efecto de las cucurbitacinas sobre los segundos mensajeros involucrados en la translocación de Glut4. A) Análisis de densitometría de la relación pAMPK/GAPDH en músculo sóleo (MS); B) Análisis de densitometría de las relaciones AMPK/GAPDH en MS; C) Análisis de densitometría de las relaciones pAKT/GAPDH en MS; D) Análisis de densitometría de las relaciones pAMPK / GAPDH en MS. E) Análisis de densitometría de la relación pAMPK/GAPDH en tejido adiposo epididimal (TAE); F) Análisis de densitometría de las relaciones AMPK/GAPDH en TAE; G) Análisis de densitometría de las relaciones pAKT/GAPDH en TAE; H) Análisis de densitometría de las relaciones pAMPK/GAPDH en TAE. El contenido proteico de GAPDH se usó como control de carga. Se muestran las medias de $n=3 \pm E.E.M.$ *, ** significativo a una $P \leq 0.01$ y 0.001 respectivamente vs NDM + Vehículo.

Estos resultados, junto con los observados en TAE y la translocación de la membrana Glut4 en ambos tejidos parecen indicar que las cucurbitacinas 1-4 disminuyen la glucemia al promover la translocación de Glut4 a PM mediante la activación de AMPK en SM (cucurbitacina 1) y tejido TAE (cucurbitacina 1, 2 y 4). Ejerciendo su efecto principalmente sobre el tejido adiposo ya que el aumento en el transporte de glucosa en este tejido es suficiente para tratar la hipoglucemia característica del modelo de diabetes *mellitus* utilizado en este experimento.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y la evidencia disponible sobre la importancia del tejido adiposo en la homeostasis energética, proponemos que las cucurbitacinas de *I. lindheimeri* ayudan a lidiar con la hiperglucemia y mejoran el aclaramiento de glucosa al estimular la absorción de este carbohidrato principalmente en el tejido adiposo al promover la translocación de Glut4 a PM de una manera dependiente de AMPK.

Estudios previos han evaluado distintas cucurbitacinas en adipocitos y miocitos que inducen la activación de AMPK similar a la observada con AICAR en ambos tejidos *in vitro*. Cuando esos triterpenos se evaluaron *in vivo*, observaron un aumento en el consumo de oxígeno (VO₂) y la relación de intercambio respiratorio (RER), que se relacionan con el gasto de energía y la oxidación de ácidos grasos, respectivamente¹⁰; dos procesos metabólicos donde el tejido adiposo juega un papel importante. La producción de lactato puede alterar el RER (el organismo intenta compensar el aumento de lactato y reducir la acidificación de la sangre al expulsar más CO₂ a través del sistema respiratorio)⁶⁰. Además, aunque hay una reducción en el nivel reportado de RER, es más alto que 0.7, cayendo en el rango de 0.7-1.0 que indica una mezcla de ácidos grasos y carbohidratos como fuente de energía⁶¹.

Se ha demostrado que un aumento de la absorción de glucosa por el tejido adiposo conduce a la producción de aproximadamente el 70% de lactato. En este estudio se sobre expresaron Glut4 y hexoquinasa II (HKII) para aumentar la absorción de glucosa⁶². Del mismo modo, las cucurbitacinas 1-4 aumentan la captación de glucosa al aumentar la translocación de Glut4 a PM en TAE a través de la activación de AMPK; además se ha reportado que la activación de AMPK aumenta la expresión de HKII^{63,64}.

La glucosa es transportada por Glut4 y es fosforilada por HKII; esta cinasa está regulada por un mecanismo de inhibición de retroalimentación inhibido por la glucosa 6-fosfato⁶⁵. La eliminación de lactato requiere su oxidación a piruvato por la lactato deshidrogenasa, luego el piruvato se oxida a dióxido de carbono en el ciclo de Krebs para posteriormente generar energía ⁶⁶. Adicionalmente, se ha reportado que en ratones con glucemia de 5 mmol / L = 90.08 mg / dL la tasa de conversión lactato-piruvato es baja comparada con ratones con una concentración de glucosa de 20 mmol / L = 360.32 mg / dL donde, la tasa de conversión de lactato-piruvato aumentó. En conjunto con el aumento en la tasa de conversión se reportó una mejora en la sensibilidad sistémica de insulina y tolerancia a glucosa⁶². Este comportamiento es consistente con el efecto inducido por las cucurbitacinas, en el que individuos diabetizados con una glucemia superior a 200 mg / dL se observó una disminución de la glucemia.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y la evidencia disponible sobre la importancia del tejido adiposo en la homeostasis energética, proponemos que las cucurbitacinas disminuyen la hiperglucemia y mejoran el aclaramiento de glucosa al estimular la absorción de este carbohidrato, principalmente en el tejido adiposo y promoviendo la translocación de Glut4 a PM de manera dependiente de AMPK. Además del aumento en la translocación de Glut4, la activación de AMPK también aumentaría la captación de glucosa al activar HKII. El aumento de la entrada de glucosa se metabolizaría en lactato y se convertiría en glucógeno o se metabolizaría en glicerol 3-fosfato (clave para la deposición de grasa) en el tejido adiposo, o viajaría en el torrente sanguíneo al hígado donde se convertiría en piruvato, ingresar a la cadena respiratoria, sin afectar los niveles sistémicos de glucosa y triacilglicerol. Además, la eliminación del lactato explicaría la disminución de glucemia; el aumento en el VO₂ y la disminución en el RER reportado para las cucurbitacinas de *Momordica charantia*¹⁰. Por lo tanto, proponemos que este pudiera ser el mecanismo de acción general para las cucurbitacinas. Sin embargo, aún se necesitan más estudios para corroborar esta hipótesis.

Acoplamiento molecular

De acuerdo con nuestros resultados 1, 2 y 4 aumentan la captación de glucosa al promover la translocación de Glut4 a través de AMPK o ambas vías AMPK / AKT. Para evaluar si los compuestos 1, 2 y 4 podrían unirse a las estructuras AKT y AMPK, se realizó un análisis de acoplamiento como se describe en la sección 2.9. AMPK es una proteína quinasa heteromérica compuesta por una subunidad catalítica (α) y dos reguladoras (β y γ) que detecta la proporción de nucleótidos de adenina mediante la unión competitiva de AMP, ADP y ATP a cuatro motivos de cistationina β -sintetasa (CBS), que funcionan como sitios de unión de nucleótidos de adenina^{67,68}.

Los resultados del acoplamiento indicaron que la cucurbitacina 1 puede unirse a CBS1, CBS3 y CBS4 con alta afinidad. Curiosamente, el análisis indicó que la afinidad del compuesto 2 con los sitios CBS 1 y 3 era aproximadamente 80 y 6 veces mayor que la del compuesto 1, pero la afinidad con CBS4 era baja (Tabla GB).

La cucurbitacina 1 se estabilizó en 4 Å de los mismos aminoácidos que interactúan con los nucleótidos de adenina en los motivos CBS1, CBS3 y CBS4. Este compuesto mostró posibles enlaces H entre R2-OH y el oxígeno en el enlace peptídico de Arg152; el -OH de C20 también con el O en el enlace peptídico de Arg152; y el -OH de C25 con el -O en la cadena lateral Thr89 en CBS1. Se sabe que Thr89 forma un enlace H con el fosfato de AMP en condiciones fisiológicas. En CBS3 1 mostró posibles enlaces H entre el oxígeno en C1 y el hidrógeno de N3 de la cadena lateral de His298; el -OH de C20 con el -O en el enlace peptídico de Gly275; y el -OH de C25 con el -O del enlace peptídico de Arg299; tanto His298 como Arg299 forman enlaces H con AMP con el fosfato y la adenina respectivamente. Además, aunque R1OH no mostró interacciones en este análisis, el hidrógeno del -OH está justo en 2.6Å del N3 de His298 y también podría estar formando un enlace H con este átomo. En el sitio CBS4, 1 mostró enlaces H potenciales entre -O de C1 y -H de N del enlace peptídico de Ala205; este aminoácido forma un enlace H con la adenina de AMP; También hay un enlace H entre el -OH de R1 con el -O del enlace peptídico de Ile204^{69,70} (Figura 10B).

El compuesto 2 se localizó dentro de 4Å de la mayoría de los aminoácidos que interactúan con los nucleótidos de adenina en los motivos CBS1, CBS3 y CBS4. Sin embargo, siendo esta cucurbitacina más voluminosa que el compuesto 1, por

impedimento estérico, no pudo interactuar con los mismos aminoácidos que su aglicona. En el sitio CBS1 estaba más allá de 4Å de Arg152; en el sitio CBS3 de Gly275, Asp245, Ser242 y Arg70; y en el sitio CBS4 de Ser316, Ser226, Ala227, Ile312 (aunque estaba cerca de Ile311) y Ser314. Esta cucurbitacina mostró posibles enlaces H entre R1-GlucC2-OH y el oxígeno en el enlace peptídico de Val83 y R1GlucC6-OH con el oxígeno del enlace peptídico de Met85 en el motivo CBS1; se sabe que Met85 forma un enlace H con la ribosa de AMP en condiciones fisiológicas. En el motivo CBS3 mostró enlaces H potenciales entre el -OH de R1GlucC4 y el -O del enlace peptídico de Glu296; la -O de R2C16 con la -H de N en el enlace peptídico de Leu277; este aminoácido forma un enlace H con la adenina de AMP⁶⁹; y el -OH de C20 con el -O del enlace peptídico de Arg299. Finalmente, en el sitio CBS4, la cucurbitacina 2 tenía enlaces H potenciales entre el -O en R1GlucC2 y el -H del N del enlace peptídico de Ala205 (Figura 10B).

De los aminoácidos ubicados dentro de 4Å, Val276 y Leu277 en el motivo CBS3 e Ile312 en CBS4, se ha demostrado que son esenciales para el correcto funcionamiento y activación de AMPK⁶⁹. His151 se une a los grupos fosfato y His298 forma enlaces de hidrógeno con los fosfatos de los nucleótidos de adenina tanto en CBS3 como en CBS4⁷⁰. Estos resultados de acoplamiento sugieren que las cucurbitacinas 1 y 2 pueden no solo estar en la proximidad de aminoácidos importantes para la activación de AMPK, sino que también pueden interactuar en los motivos CBS de forma similar a como AMP activa esta quinasa. El análisis de acoplamiento también indicó que C1, C2 y sus sustituyentes probablemente interactúen con CBS3 y CBS4, los más importantes para la detección de nucleótidos de adenina y la activación de AMPK, que es congruente con lo que se informó anteriormente para este dominio, siendo el más importante para otros efectos biológicos de las cucurbitacinas^{71,72}.

Sorprendentemente, al comparar los resultados de afinidad con los resultados de activación de AMPK (Figura 9) para el compuesto 2, observamos que incluso cuando tiene una alta afinidad por estos dos sitios, particularmente con CBS3, que se considera el sitio sensor de nucleótidos de adenina, la activación de esta quinasa es casi la mitad de la observada en DM tratada con 1 en EAT y mucho menor en SM. Algunos estudios han demostrado que es precisamente esta unión de AMP al sitio CBS4 la que estabiliza

la molécula en una conformación que permite la preferencia de unión de AMP al sitio CBS3 manteniendo la relación de alta afinidad por AMP / baja afinidad por ATP; cuando CBS4 no se une al AMP, esta relación de afinidad se invierte aumentando la afinidad por el ATP, lo que impide la detección de nucleótidos de adenina y, por tanto, la activación de AMPK⁶⁹. Nuestros resultados de acoplamiento indican que es probable que estos compuestos interactúen con AMPK de manera similar a AMP y ADP en los motivos CBS1, CBS3 y CBS4, por lo que parece lógico que, al no tener una alta afinidad por el sitio CBS4, la cucurbitacina **2** tenga menos efecto sobre la activación de esta enzima.

Se observó que el compuesto 4 estaba unido a un sitio diferente de la estructura cerca de los otros compuestos, pero con una afinidad muy baja. Aunque el análisis de acoplamiento indicó que el compuesto 4 (un compuesto más voluminoso) no se une adecuadamente a ninguna de las estructuras, estos resultados no descartan la interacción de este compuesto con las quinasas. Dado que las estructuras de las proteínas son bastante dinámicas, es posible que en otra conformación esta proteína pueda unirse al compuesto 4 con mayor afinidad.

AKT es una proteína quinasa de serina-treonina activada por la fosforilación de los dos residuos críticos: Thr308 y Ser473, que induce un cambio conformacional sustancial aumentando su actividad quinasa⁷³. El análisis de acoplamiento de nuestros compuestos contra esta quinasa indicó que los compuestos 1 y 2 pueden unirse con alta afinidad a un sitio cercano al sitio de unión del inhibidor competitivo de AKT G98, con valores teóricos de Kd de 1.43 y 37.05 μ M, respectivamente (Figura 10A, Tabla G). También se observó que, a diferencia del inhibidor de G68, los compuestos 1 y 2 no bloquean el acceso de ATP al sitio de unión. Con respecto al compuesto 4, los resultados indicaron que puede unirse, pero con baja afinidad, a un sitio diferente cerca de la entrada al sitio de unión de ATP. Al relacionar este resultado con los de la Figura 9I, donde se observa que las cucurbitacinas 1 y 2 promueven la activación de AKT en EAT, parece contradictorio que las interacciones de estos compuestos sean cerca de un sitio de inhibición de AKT. Sin embargo, se ha informado de que los inhibidores competitivos con ATP causan una hiperfosforilación de AKT al estabilizar una conformación en la que ambos sitios fosforilados eran inaccesibles para las fosfatasa^{73,74}. Como nuestros compuestos muestran una alta afinidad por el sitio de unión del inhibidor competitivo,

pero no bloquean el acceso de ATP, es posible que ayuden a estabilizar la conformación de AKT para mantener la fosforilación por AMPK, permitiendo así la unión de ATP creando un bucle de retroalimentación positiva para la activación de la vía AKT. En la misma línea de pensamiento, siendo 4 el compuesto más voluminoso, su impedimento estérico impediría la formación de la conformación estable de AKT, lo que explicaría por qué no observamos un aumento de pAKT en los grupos tratados con este compuesto. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar esta hipótesis. Probablemente la actividad de 4 se deba a su cambio de conformación en comparación con las cucurbitacinas 1, 2 y 3. Este resultado sugiere que posiblemente 4 se une a AMPK y AKT en sitios distintos de los sitios de unión de 1 y 2 (Figura 10).

Tabla G. Resultados del análisis de acoplamiento de los compuestos 1, 2 y 3. A) con el sitio activo de AKT y B) con sitios de cistationina β -sintetasa (CBS) de AMPK. B.E. = energía de enlace, K_d = constante de disociación estimada. Nótese que no se encontró ningún enlace.

A) AKT						
	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 4	
Sitio de interacción	B.E. kCal/mol	K_d (μ M)	B.E. kCal/mol	K_d (μ M)	B.E. kCal/mol	K_d (mM)
Sitio de unión a ATP	-7.97	1.43	-6.05	37.05	-3.05	5.83
B) AMPK						
Cbs1	-6.46	18.4	-9.08	0.22	-3.23	4.26
Cbs3	-6.31	23.57	-7.32	4.11	-3.3	N.B.
Cbs4	-6.36	21.83	-3.46	2890	-1.73	54.39

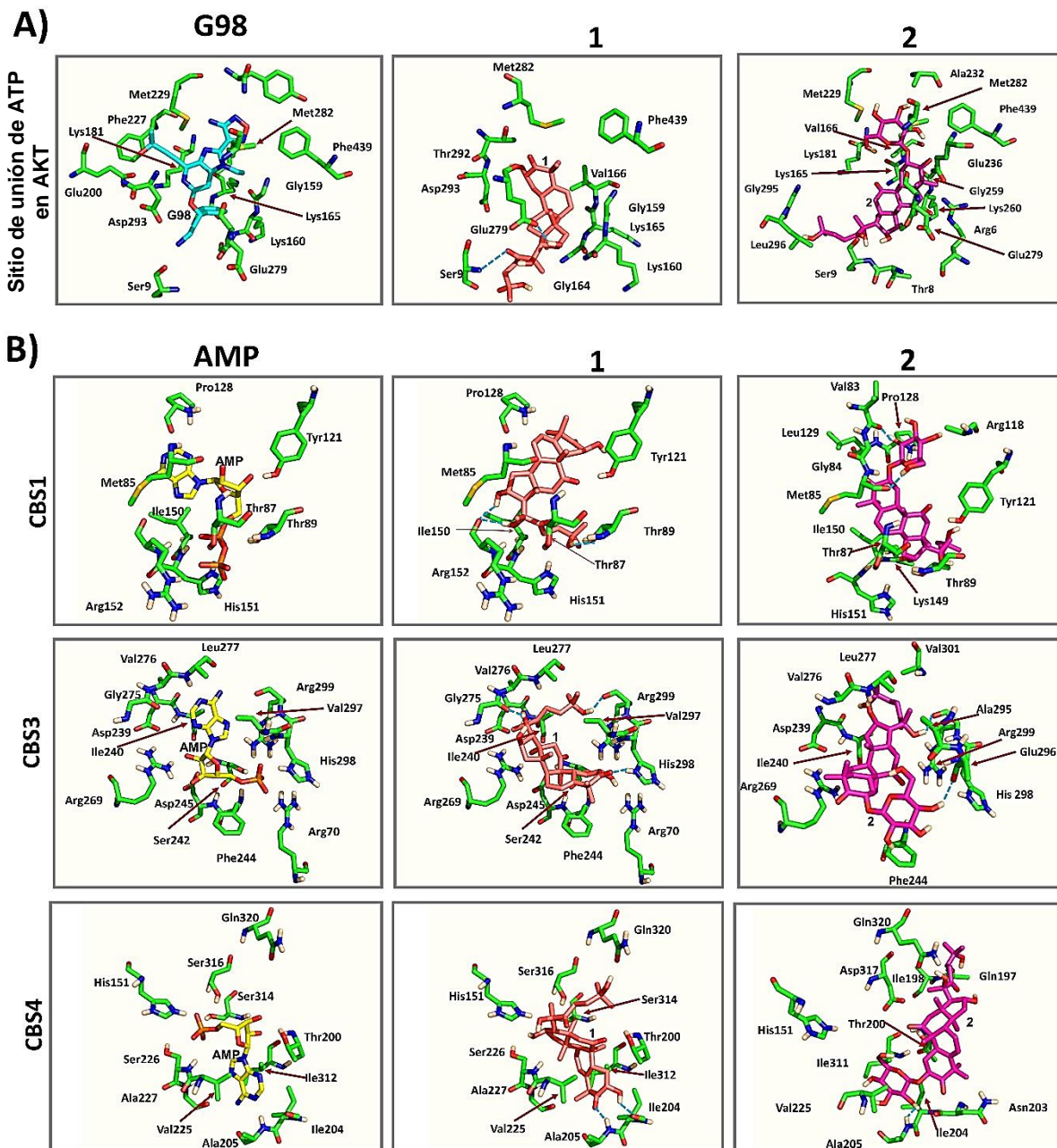


Figura 10. Unión de los compuestos 1 y 2 a AKT y AMPK. A) Unión de los compuestos 1 y 2 al sitio de unión de ATP de AKT que muestra el inhibidor G98, compuestos 1 y 2 unidos. B) Unión de los compuestos 1 y 2 a los sitios de cistationina β -sintetasa (CBS) CBS1, CBS3 y CBS4 de AMPK. Los paneles muestran los residuos del sitio activo de las enzimas ubicadas dentro de 4Å de los compuestos 1 y 2. Los aminoácidos (coloreados en verde) y los compuestos 1 (coloreados en rosa) y 2 (coloreados en magenta) se muestran como barras. Para AKT, el inhibidor G98 se muestra en cian, mientras que para AMPK, ADP unido a CBS1 y AMP unido a CBS3 y CBS4 se muestran en amarillo. Los enlaces H de los compuestos con residuos del sitio de unión de las enzimas se indican con una línea discontinua naranja. La figura se dibujó con pymol Versión 2.1.0 (Schrödinger, LLC; <https://sourceforge.net/p/pymol>).

Estos resultados indican que las cucurbitacinas pueden, de hecho, unirse y modular la actividad de las quinasas AKT y AMPK, promoviendo la translocación de Glut4 a la membrana de una manera dependiente del tejido.

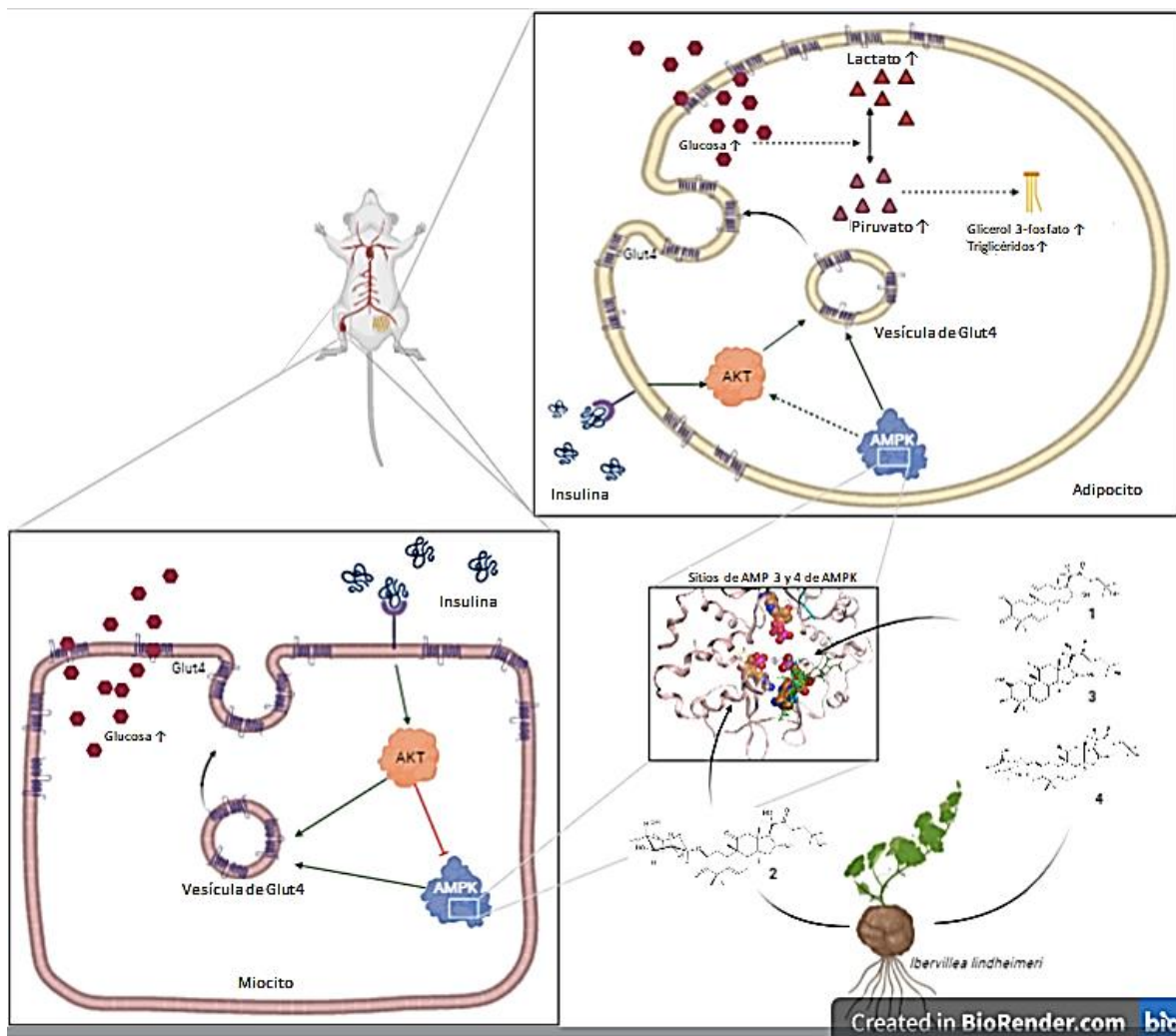


Figura 11. Mecanismo de acción tejido dependiente propuesto para las cucurbitacinas aisladas de *I. lindheimeri*. Las cucurbitacinas disminuyen la hiperglucemia y mejoran el aclaramiento de glucosa al estimular la absorción de este carbohidrato principalmente en el tejido adiposo. 1, 2 y 4 promueven la translocación de Glut4 a MP activando directamente a AMPK en los sitios CBS3 y CBS4 y en tejido adiposo indirectamente a AKT (AMPK regularía positivamente a AKT). Además del aumento en la translocación de Glut4, el aumento de la entrada de glucosa se metabolizaría en lactato y se convertiría en glucógeno o se metabolizaría en glicerol 3-fosfato (clave para la deposición de grasa) en el tejido adiposo o viajaría en el torrente sanguíneo al hígado donde se convertiría en piruvato, ingresar a la cadena respiratoria, sin afectar los niveles sistémicos de glucosa y triacilglicerol.

Evaluación del efecto sobre la producción de glucosa a partir de piruvato de las cucurbitacinas 1, 2 y 4

No obstante, la relativamente baja translocación de Glut4 a PM, la no activación de AMPK en MS y el efecto antihiper glucémico presentado por los compuestos 2 y 4 también sugiere un mecanismo de acción independiente de la vía de señalización de Glut4. La actividad antihiper glucémica se ha asociado con la inhibición de la liberación de glucosa hepática; otro mecanismo de acción independiente de la insulina que se ha

descrito para la cucurbitacina D²⁷, razón por la cual se decidió llevar a cabo una curva de tolerancia al piruvato.

Se realizó una prueba de tolerancia a piruvato con el fin de determinar si la cucurbitacinas aisladas de *I. lindheimeri* tienen algún efecto sobre la gluconeogénesis hepática como se describió previamente. Los resultados indican que ninguna de las cucurbitacinas evaluadas fue capaz de inhibir el aumento en la glucemia observado tras la administración de piruvato, más aún los tratamientos aumentan la producción de glucosa a partir de este precursor. Tanto 1 como 4 aumentan la glucemia a más del doble a partir de los 15 minutos, no obstante, en el grupo tratado con el compuesto 1 se observa una pronunciada disminución de glucemia a partir de este intervalo de tiempo regresando a valores basales. En cambio, el compuesto 4 provoca un aumento de concentración en la glucosa en sangre el cual se mantiene hasta el minuto 60 a partir del cual la glucemia comienza a disminuir. Finalmente, el compuesto 2 si bien aumenta la glucemia, lo hace de una manera gradual y en menor medida que las otras dos cucurbitacinas alcanzándose el máximo al minuto 60 a partir del cual comienza a disminuir la concentración de glucosa en sangre. Nuevamente, se observan tres comportamientos muy diferentes entre las moléculas los cuales pueden ser explicados por la diferencia entre sus estructuras, en conjunto todas las cucurbitacinas parecen aumentar la producción de glucosa a partir de piruvato.

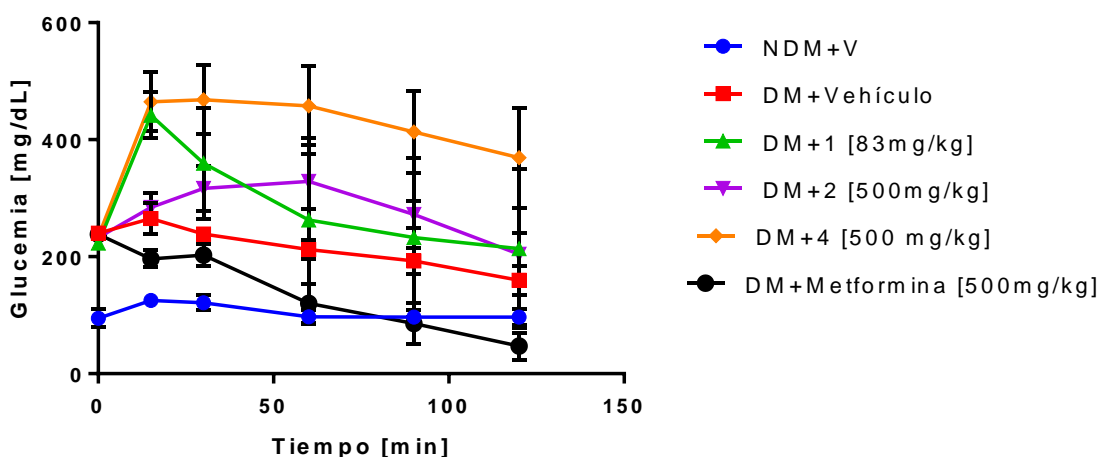


Figura 12. Efecto sobre la producción de glucosa a partir de piruvato de las cucurbitacinas 1, 2 y 4. Curva de tolerancia a piruvato. NDM= ratones CD1 no diabéticos, DM= ratones CD1 diabéticos; 1= 23,24 dihidrocucurbitacina; 3= 2,16 diacetil 23,24 dihidrocucurbitacina D; 2= 2-O-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D; 4= 2,3,4,6, tetracetil la 2-O-β glucopiranosil, 16 acetil, 23, 24 dihidrocucurbitacina D. Se muestra n=3 ± EEM.

Considerando el mecanismo de acción de las cucurbitacinas de aumentar la absorción de glucosa, y la propuesta de que este incremento promueve la producción de lactato y, por lo tanto, la producción de piruvato, el aumento de la gluconeogénesis podría deberse a que los otros mecanismos para procesar el piruvato (glucogenogénesis, metabolizado a glicerol 3-fosfato o ingresar a la cadena respiratoria) ya están saturados entonces, cuando se administra piruvato de sodio, la mayor parte se anabóliza a glucosa. Sin embargo, se necesitan más pruebas para saber a qué nivel las cucurbitacinas realizan su efecto potenciador de gluconeogénesis.

Otros resultados

La creciente evidencia de que los compuestos farmacológicos llevan a cabo sus efectos mediante diferentes blancos ha llevado a proponer el concepto de compuestos con blancos terapéuticos múltiples. Los productos naturales son una buena fuente de nuevos compuestos debido a su diversidad y estructura compleja y la mayoría tienen blancos múltiples. Existen estudios que hablan de la actividad antiinflamatoria de AMPK al inhibir la liberación de citosinas pro inflamatorias, características de la inflamación de grado bajo, relacionadas con desordenes metabólicos y desarrollo de cáncer^{12,48}.

Tomando esto en cuenta se decidió probar la actividad el efecto de las cucurbitacinas sobre otras actividades reportadas para el "Wereque". Se evaluaron de manera preliminar las actividades antiinflamatoria y antiproliferativa de las cucurbitacinas aisladas de la raíz de *I. lindheimeri* y sus derivados acetilados.

Actividad antiinflamatoria

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de las cucurbitacinas 1, 2, 3 y 4 mediante la prueba de 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) en función de la inhibición de edema provocado por la administración de este compuesto (Figura 13). Los resultados de esta prueba mostraron que los compuestos 1, 3 y 4 inhibieron el edema del $67.73 \pm 10.28\%$, $87.27 \pm 6.56\%$ y $71.14 \pm 12.65\%$, respectivamente, generado por TPA. Es importante resaltar que la acetilación en la posición C2 aumenta la actividad antiinflamatoria de ambas cucurbitacinas nativas; el caso más notable el de los

compuestos 2 y su derivado acetilado 4 donde la actividad aumenta 96.80% (de 2.27 ± 5.63 a $71.14 \pm 12.65\%$) de inhibición. Este efecto también se observa, aunque en menor medida en los compuestos 1 y su derivado acetilado 3 donde el aumento de actividad fue de un 22.39% siendo este último el compuesto de mayor actividad antiinflamatoria.

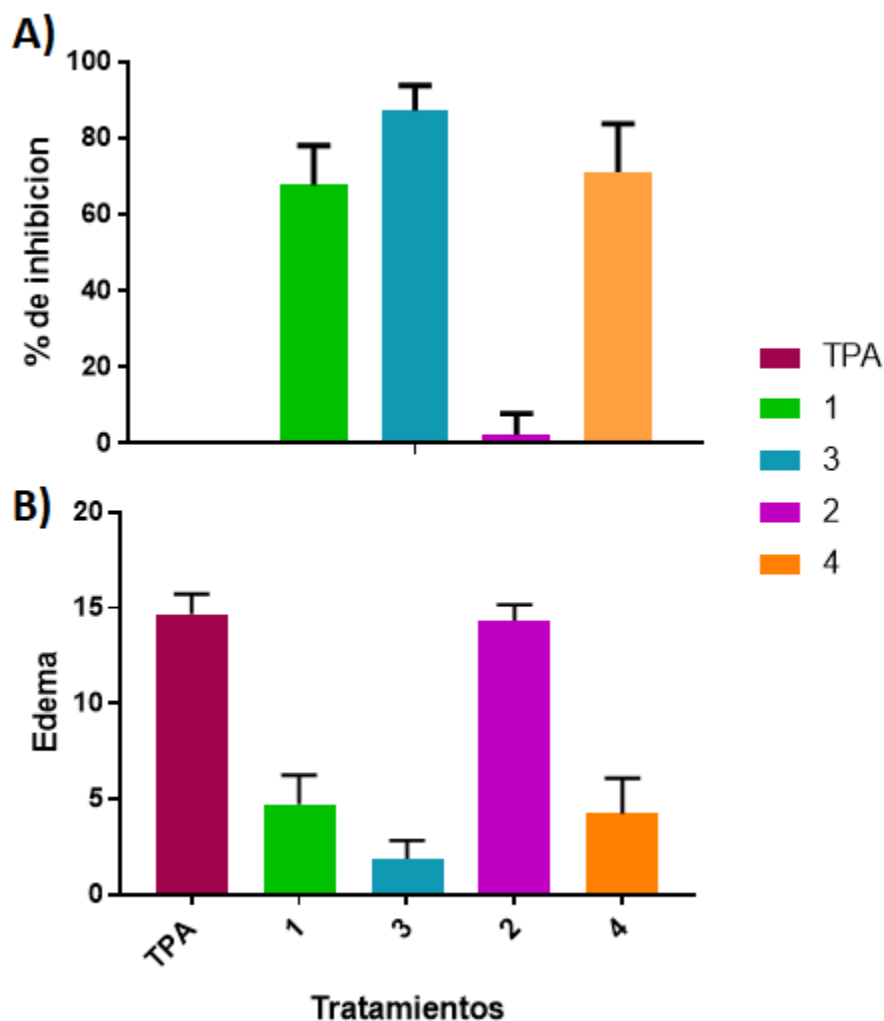


Figura 13. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 23,24-dihidrocurbitacina D(1), Acetato de 23,24-dihidrocurbitacina D (3), 2-*O*-glucopiranosil 23,24-dihidrocurbitacina D(2), acetato de 2-*O*-glucopiranosil 23,24-dihidrocurbitacina D(4). ** $p \leq 0.01$ vs TPA. Se muestra $n=3 \pm$ EEM.

Actividad citotóxica

La inflamación predispone al desarrollo de cáncer y promueve todas las etapas de la tumorigénesis⁷⁵; teniendo en cuenta los resultados positivos de la prueba de actividad antiinflamatoria se decidió evaluar la actividad antiproliferativa de los

compuestos 1-4 en las líneas celulares cancerosas: U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama y SKLU= pulmón a una concentración de 50µg/mL (Figura 14A). De los compuestos evaluados 1, 3 y 4 mostraron un porcentaje de inhibición superior al 60% en todas las líneas celulares empleadas en este experimento; nuevamente el compuesto 2 mostró poca actividad biológica.

Tras comprobarse la actividad citotóxica se evaluó la concentración inhibidora máxima media (IC₅₀) de los compuestos 1, 3 y 4 en U251, PC-3 y SKLU-1 (Figura 14B) donde el compuesto más efectivo fue el 1 seguido del 4 y finalmente el 3. Nuevamente, se resalta la importancia de la posición C2 para la actividad biológica de estos compuestos, ya que en el caso de 2 y 4 la acetilación de este compuesto le confiere una actividad citotóxica alta y de gran efectividad, mientras que, si bien los compuestos 1 y 3 presentan actividad citotóxica, el compuesto 1 pierde cierto grado de efectividad al encontrarse acetilado en C2 y C16(cucurbitacina 3).

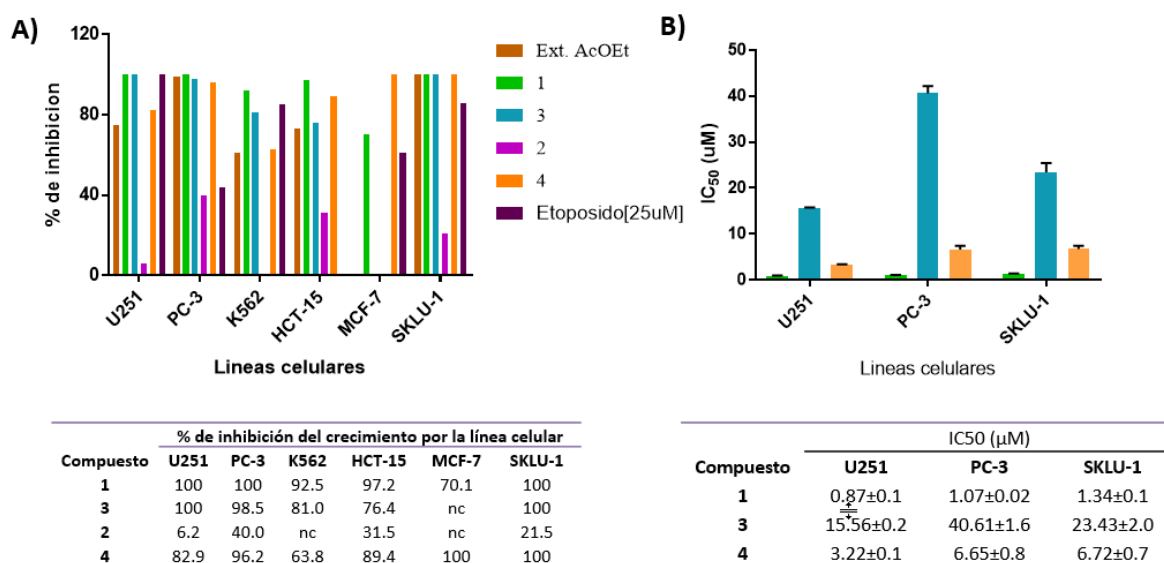


Figura 14. Actividad antiproliferativa de las cucurbitacinas aisladas de *I. lindheimeri* y sus derivados acetilados. A) Prueba de citotoxicidad a una concentración de 50µg/mL B) Concentración inhibidora máxima media en tres líneas celulares. 23,24-dihidrocucurbitacina D (1), Acetato de 23,24-dihidrocucurbitacina D (3), 2-*O*-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D (2), acetato de 2-*O*-glucopiranosil 23,24-dihidrocucurbitacina D (4) en función de la inhibición de crecimiento en las líneas celulares (U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama y SKLU= pulmón) y etoposido como control positivo. n=3

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que el extracto de AcOEt de la raíz de *I. lindheimeri* y las cucurbitacinas 1 y 2 así como el derivado acetilado 4 reducen la glucemia *in vivo* en un modelo de diabetes inducida. Los tres compuestos estimulan la absorción de glucosa al promover la translocación de Glut4 a PM a través de la vía AMPK de manera independiente de la insulina tejido específica, teniendo su efecto principal en el tejido adiposo. Estos resultados indican que a pesar de que *I. lindheimeri* no es la especie tradicionalmente usada para el tratamiento de diabetes, esta especie posee propiedades antidiabéticas, constituyéndose como una nueva fuente potencial para la obtención de nuevos compuestos para el tratamiento de diabetes. Nuestros resultados se unen a las evidencias que sugieren que el tejido adiposo juega un papel primordial en el desarrollo de diabetes y sus síntomas destacándolo como un blanco terapéutico y compuestos capaces de aumentar la absorción de glucosa en este tejido, como las cucurbitacinas 1, 2 y 4, fármacos potenciales para el tratamiento de la diabetes. Mostramos además la importancia del sustituyente de la posición C-2 de estos compuestos para ejercer un efecto sobre la glucemia y los mecanismos de acción de los efectos observados. C-2 es importante también en las actividades antiinflamatoria y anti proliferativa de estos triterpenos.

Referencias

1. Información básica de la diabetes: American Diabetes Association®. Available at: <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/>. (Accessed: 6th February 2019)
2. Menéndez Torre, E. *et al.* Recommendations for the pharmacologic treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes. Consensus document. *Nefrol. (English Ed.* **31**, 17-26 (2011).
3. Upendra Rao, M., Sreenivasulu, M., Chengaiah, B., Jaganmohan Reddy, K. & Madhusudhana Chetty, C. Herbal medicines for diabetes mellitus: A review. *Int.*

- J. PharmTech Res.* **2**, 1883–1892 (2010).
4. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E. Production of plant secondary metabolites : a historical perspective. **161**, 839–851 (2001).
 5. Hernandez. Producción de extractos de *Ibervillea sonora* y su evaluación biológica in vitro e in vivo . 83 (2011).
 6. Emerson, J. T. & Welker, W. H. Some notes on the chemical toxicity of *Ibervillea sonora*. *J. Biol. Chem.* **5**, 339–350 (1909).
 7. Torres F, Z. M. Las plantas pueden ser fuente de compuestos antidiabéticos que aún no han sido científicamente validados. *Cienc. Salud* **1**, 11–18 (2013).
 8. Andrade-Cetto, A. & Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* **99**, 325–348 (2005).
 9. Figueroa-Hernández, J. L. & Martínez-Vázquez, M. Chemical constituents from *Ibervillea lindheimeri* (A. Gray) Greene. *Biochem. Syst. Ecol.* **54**, 237–239 (2014).
 10. Tan, M. J. *et al.* Antidiabetic Activities of Triterpenoids Isolated from Bitter Melon Associated with Activation of the AMPK Pathway. *Chem. Biol.* **15**, 263–273 (2008).
 11. Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G. A., Grossman, A. B. & Korbonits, M. Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 205–215 (2006).
 12. Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1016–23 (2011).
 13. Muoio, D. M. & Newgard, C. B. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 193–205 (2008).
 14. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813–820 (2001).
 15. Weir, G. C. & Bonner-weir, S. Five Stages of Evolving β -Cell Dysfunction During Progression to Diabetes Gordon. *Diabetes* **53**, 34–41 (2004).
 16. Obrosova, I. G. *et al.* Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activation in Diabetic Neuropathy. *Diabetes* **53**, 711–720 (2004).
 17. Garcia, C. *et al.* Diabetes and inflammation: Fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab.* **36**, 327–338 (2010).

18. Rivera-Ramírez, F., Escalona-Cardoso, G. N., Garduño-Siciliano, L., Galaviz-Hernández, C. & Paniagua-Castro, N. Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, (2011).
19. Hernández-Galicia, E., Calzada, F., Roman-Ramos, R. & Alarcón-Aguilar, F. J. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: Isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med.* **73**, 236–240 (2007).
20. Chen, J. C., Chiu, M. H., Nie, R. L., Cordell, G. a & Qiu, S. X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 386–399 (2005).
21. Text available under a CC-BY-SA Creative Commons Attribution License. *Ibervillea lindheimeri*. *www.llifl.com* (2005). Available at: http://www.llifl.com/Encyclopedia/SUCCULENTS/Family/Cucurbitaceae/31787/Ibervillea_lindheimeri. (Accessed: 24th October 2019)
22. Alghasham, A. A. Cucurbitacins - a promising target for cancer therapy. *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. **7**, 77–89 (2013).
23. Kaushik, U., Aeri, V. & Mir, S. R. Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. *Pharmacogn. Rev.* **9**, 12–18 (2015).
24. Tan, S. P., Kha, T. C., Parks, S. E. & Roach, P. D. Bitter melon (*Momordica charantia* L.) bioactive composition and health benefits: A review. *Food Rev. Int.* **32**, 181–202 (2016).
25. Iglesias, M. A. *et al.* AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes* **51**, 2886–94 (2002).
26. Guerrero-Analco, J. *et al.* Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry* **68**, 2087–2095 (2007).
27. Pan, J. Y. & Zhang, Y. Cucurbitacin-D inhibits hepatic gluconeogenesis through activation of Stat3 signaling. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **10**, 2582–2589 (2017).
28. Cong, L. *et al.* Physiological Role of Akt in Insulin- Stimulated Translocation of GLUT4 in Transfected Rat Adipose Cells. *Mol.Endocrinol* **11**, 1881–1890 (1997).
29. Leto, D. & Saltiel, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control

- of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 383–96 (2012).
30. Webster, I., Friedrich, S. O., Lochner, A. & Huisamen, B. AMP kinase activation and glut4 translocation in isolated cardiomyocytes. *Cardiovasc. J. Afr.* **21**, 72–8 (2010).
 31. Shackelford, D. B. & Shaw, R. J. The LKB1-AMPK pathway: Metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* **9**, 563–575 (2009).
 32. Mîinea, C. P. *et al.* AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem. J.* **391**, 87–93 (2005).
 33. Sano, H. Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *J. Biol. Chem.* **278**, 14599–14602 (2003).
 34. Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S. & Gesheva, E. Stress-Protective Role of Secondary Metabolites : Diversity of Functions and Mechanisms. (2008).
 35. Daniele, M. *et al.* Comparison of HSCORE Assessment of Endometrial β 3 Integrin Subunit Expression with Digital HSCORE Using Computerized Image Analysis (ImageJ). *Anal Quant Cytopathol Histopathol* **35**, 210–6 (2013).
 36. Yamamoto, N., Yamashita, Y., Yoshioka, Y., Nishiumi, S. & Ashida, H. Rapid Preparation of a Plasma Membrane Fraction: Western Blot Detection of Translocated Glucose Transporter 4 from Plasma Membrane of Muscle and Adipose Cells and Tissues. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 29.18.1-29.18.12 (2016). doi:10.1002/cpps.13
 37. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
 38. Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. Software news and update a semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **28**, 1145–1152 (2007).
 39. Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R. & Mata, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **35**, 275–283 (1992).
 40. Dang, G. van, Rode, B. M. & Stuppner, H. Quantitative electronic structure-

activity relationship (QESAR) of natural cytotoxic compounds: maytansinoids, quassinoids and cucurbitacins. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2**, 331–350 (1994).

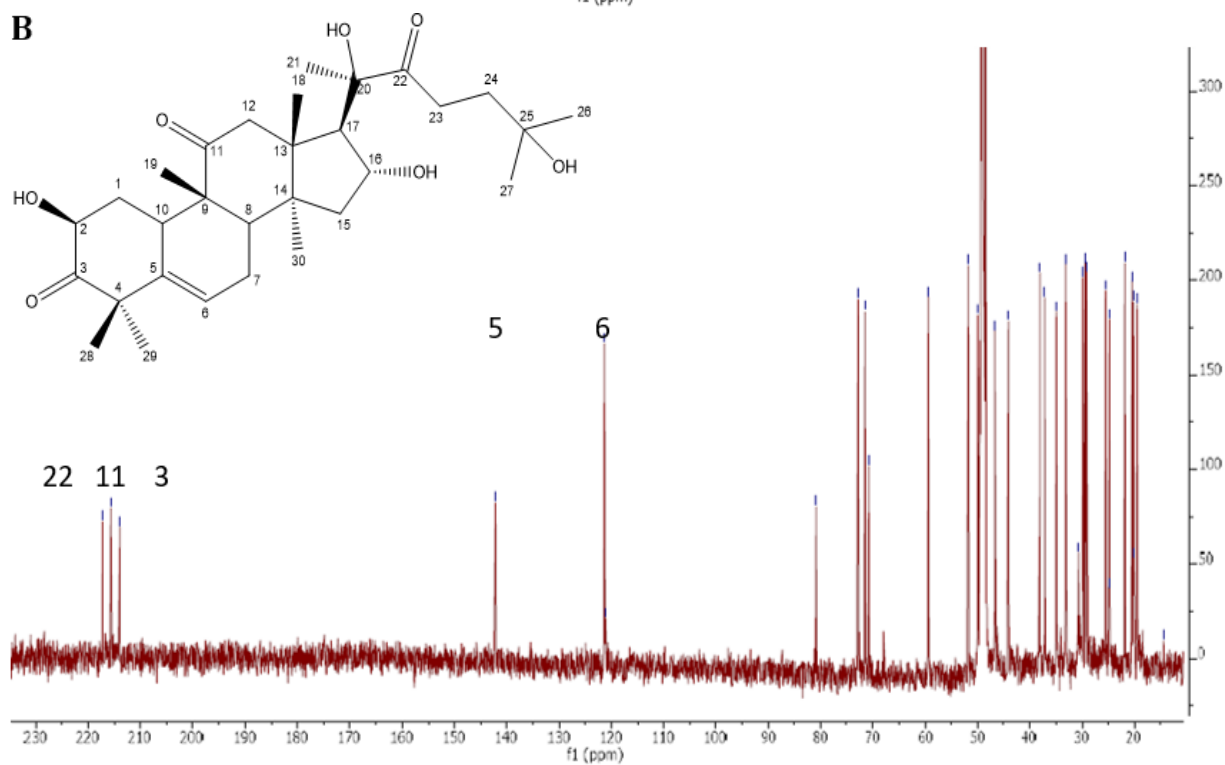
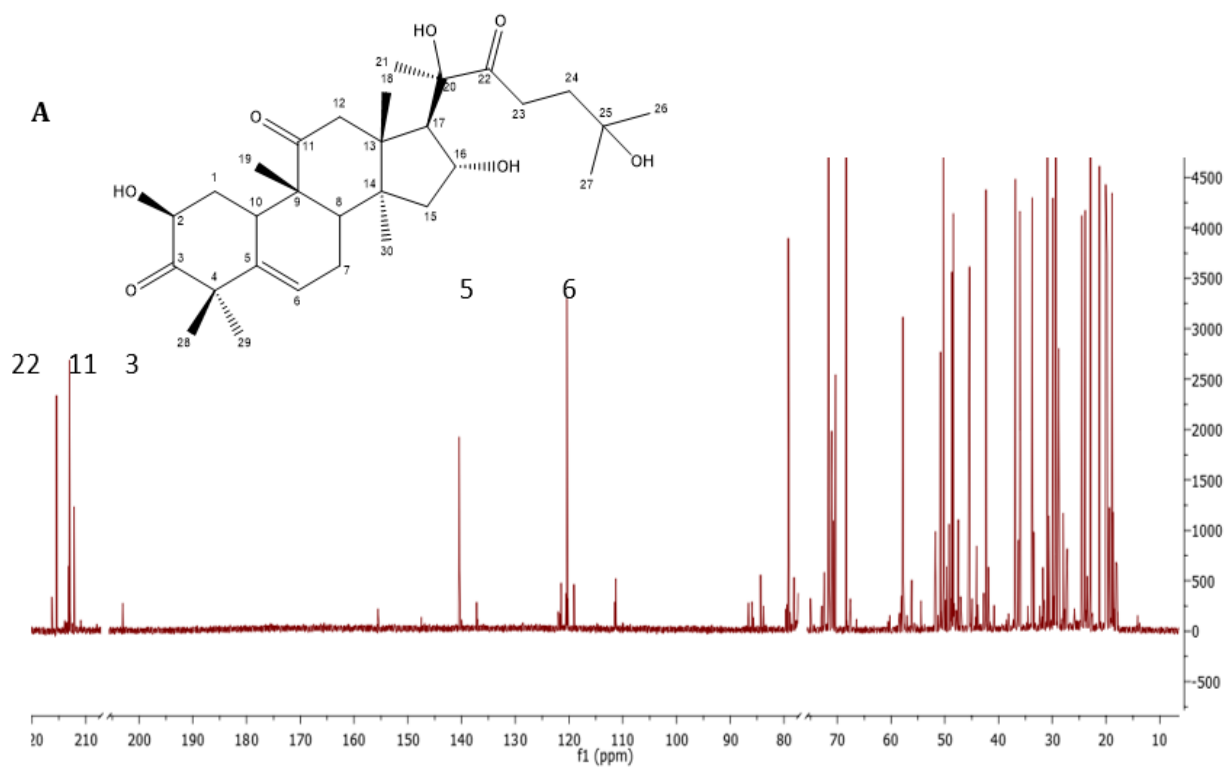
41. Fujita, S. *et al.* Dammarane glycosides from aerial parts of *Neoalsomitra integrifoliola*☆. *Phytochemistry* **38**, 465–472 (1995).
42. Yamada, Y., Hagiwara, K., Iguchi, K., Suzuki, S. & Hsu, H. Y. Isolation and structures of arvenins from *Anagallis arvensis* L. (Primulaceae). New cucurbitacin glucosides. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **26**, 3107–12 (1978).
43. Balkema-Boomstra, A. G. *et al.* Role of Cucurbitacin C in Resistance to Spider Mite (*Tetranychus urticae*) in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Chem. Ecol.* **2003 291** **29**, 225–235 (2003).
44. Zhao, C. *et al.* Potential of Cucurbitacin B and Epigallocatechin Gallate as Biopesticides against *Aphis gossypii*. (2021). doi:10.3390/insects12010032
45. White, A., Cat, A. N. D., Montezano, A., Salt, I. & Touyz, R. AMPK as a therapeutic target for metabolic disorders: interactions with the renin–angiotensin–aldosterone system in adipocytes. *Lancet* **387**, S105 (2016).
46. Yagasaki, K. Anti-diabetic phytochemicals that promote GLUT4 translocation via AMPK signaling in muscle cells. *Nutr. Aging* **2**, 35–44 (2014).
47. Rena, G., Pearson, E. R. & Sakamoto, K. Molecular mechanism of action of metformin: Old or new insights? *Diabetologia* **56**, 1898–1906 (2013).
48. Violette, B. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. (Lond)*. **122**, 253–70 (2012).
49. Ho, C. H., Ho, M. G., Ho, S. P. & Ho, H. H. Bitter bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) toxicity. *J. Emerg. Med.* **46**, 772–775 (2014).
50. Hernández Figueroa, J. L. Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. *Rev. Digit. Univ.* **10**, 12 (2009).
51. Saade, M., Magdalou, J., Ouaini, N. & Greige-Gerges, H. Stability of cucurbitacin E in human plasma: Chemical hydrolysis and role of plasma esterases. *Biopharm. Drug Dispos.* **30**, 389–397 (2009).
52. Camps, M. *et al.* Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem. J.* **282**, 765–772 (1992).

53. Abel, E. D. *et al.* Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**, 729–733 (2001).
54. Huang, S. & Czech, M. P. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metab.* **5**, 237–252 (2007).
55. Tao, R. *et al.* AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. *J. Mol. Signal.* **5**, 1–9 (2010).
56. Hayashi, K., Kojima, R. & Ito, M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1110–9 (2006).
57. Zhao, Y. *et al.* ROS signaling under metabolic stress: Cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Molecular Cancer* **16**, 1–12 (2017).
58. Ning, J., Xi, G. & Clemmons, D. R. Suppression of AMPK Activation via S485 Phosphorylation by IGF-I during Hyperglycemia Is Mediated by AKT Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* **152**, 3143–3154 (2011).
59. Kersten, S., Desvergne, B. & Wahli, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**, 421–424 (2000).
60. Katch, V. L., McArdle, W. D. & Katch, F. I. *Essentials of exercise physiology: Fourth edition. Essentials of Exercise Physiology: Fourth Edition* (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
61. Wilmore, J. H., Costill, D. L. & Gleim, G. W. Physiology of Sport and Exercise. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **27**, 792 (1995).
62. Muñoz, S. *et al.* Chronically increased glucose uptake by adipose tissue leads to lactate production and improved insulin sensitivity rather than obesity in the mouse. *Diabetologia* **53**, 2417–2430 (2010).
63. Lage, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A. & López, M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends in Molecular Medicine* **14**, 539–549 (2008).
64. Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J. & Winder, W. W. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J. Appl. Physiol.* **87**, 1990–1995 (1999).
65. Roberts, D. J. & Miyamoto, S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell*

- Death and Differentiation* **22**, 248–257 (2015).
66. Adeva-Andany, M. *et al.* Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* **17**, 76–100 (2014).
 67. Lin, S. C. & Hardie, D. G. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab.* **27**, 299–313 (2018).
 68. Xin, F. J., Wang, J., Zhao, R. Q., Wang, Z. X. & Wu, J. W. Coordinated regulation of AMPK activity by multiple elements in the α -subunit. *Cell Research* **23**, 1237–1240 (2013).
 69. Gu, X. *et al.* Deconvoluting AMP-activated protein kinase (AMPK) adenine nucleotide binding and sensing. *J. Biol. Chem.* **292**, 12653–12666 (2017).
 70. Yan, Y., Zhou, X. E., Xu, H. E. & Melcher, K. Structure and Physiological Regulation of AMPK. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
 71. Ríos, J. L., Andújar, I., Escandell, J. M., Giner, R. M. & Recio, M. C. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 1663–76 (2012).
 72. Chung, S. O., Kim, Y. J. & Park, S. U. An updated review of cucurbitacins and their biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal* **14**, 562–566 (2015).
 73. Okuzumi, T. *et al.* Inhibitor hijacking of Akt activation. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 484–493 (2009).
 74. Lin, K. *et al.* An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Sci. Signal.* **5**, ra37–ra37 (2012).
 75. Greten, F. R. & Grivennikov, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **51**, 27–41 (2019).

Anexos

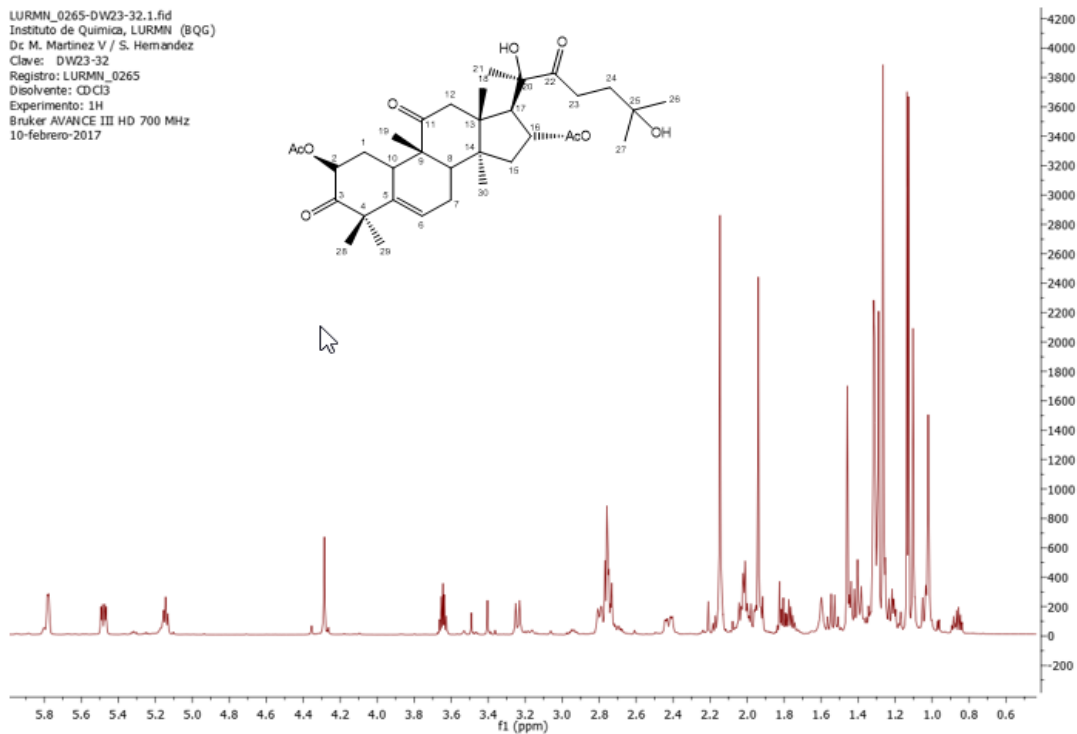
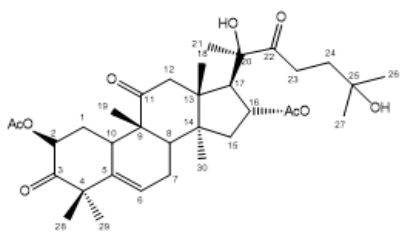
Espectros de resonancia magnética nuclear de los
compuestos aislados y sintetizados



Anexo I. Espectro de RMN de la 23,24- dihidrocucurbitacina D (1). A) Espectro de RMN de ^1H de la 1. B) Espectro de RMN de ^{13}C de la 1. Reportado por Figueroa, Martínez, 2014.

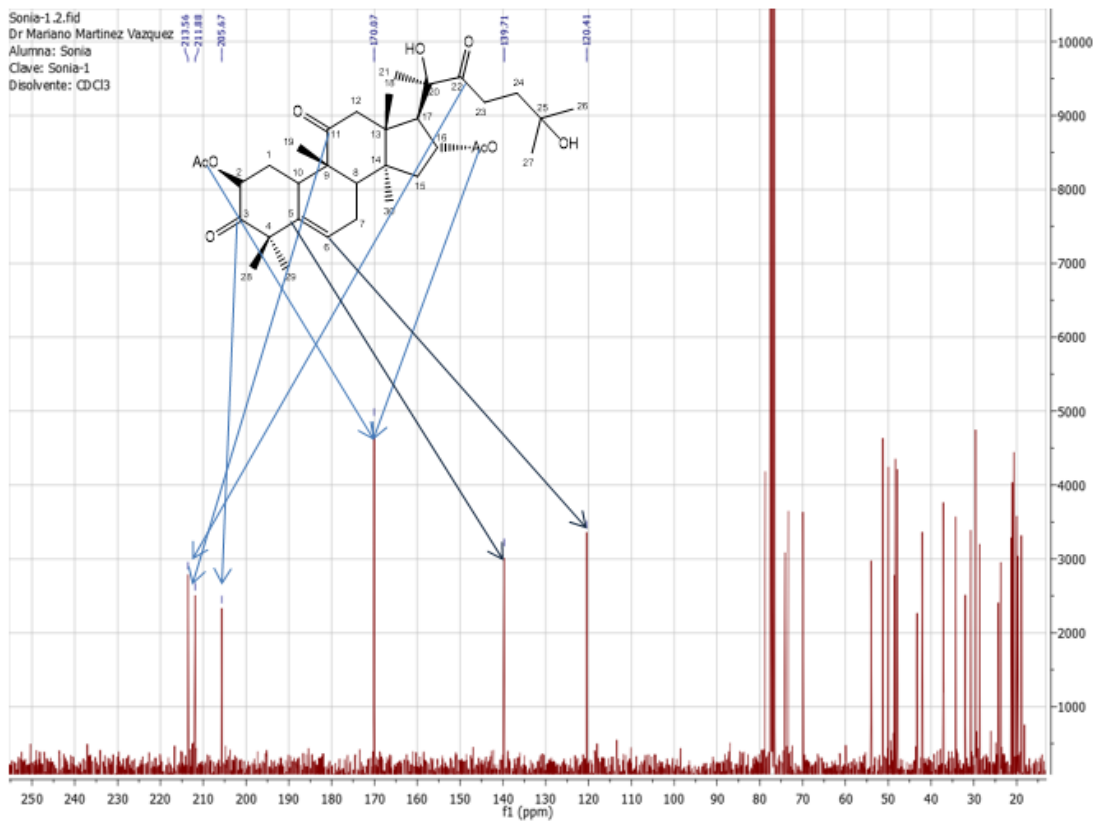
A)

LURMN_0265-DW23-32.1.fid
 Instituto de Química, LURMN (BQG)
 Dr. M. Martínez V / S. Hernández
 Clave: DW23-32
 Registro: LURMN_0265
 Disolvente: CDCl₃
 Experimento: 1H
 Bruker AVANCE III HD 700 MHz
 10-febrero-2017



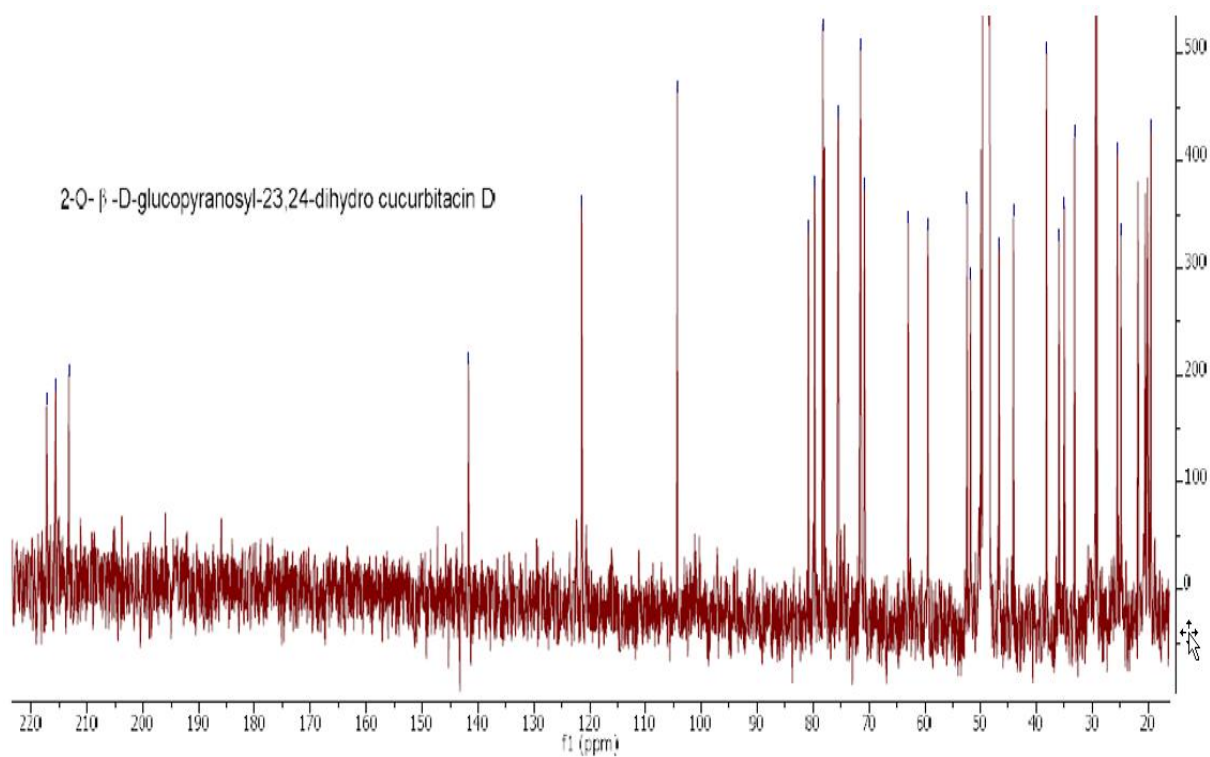
B)

Sonia-1.2.fid
 Dr Mariano Martínez Vázquez
 Alumna: Sonia
 Clave: Sonia-1
 Disolvente: CDCl₃

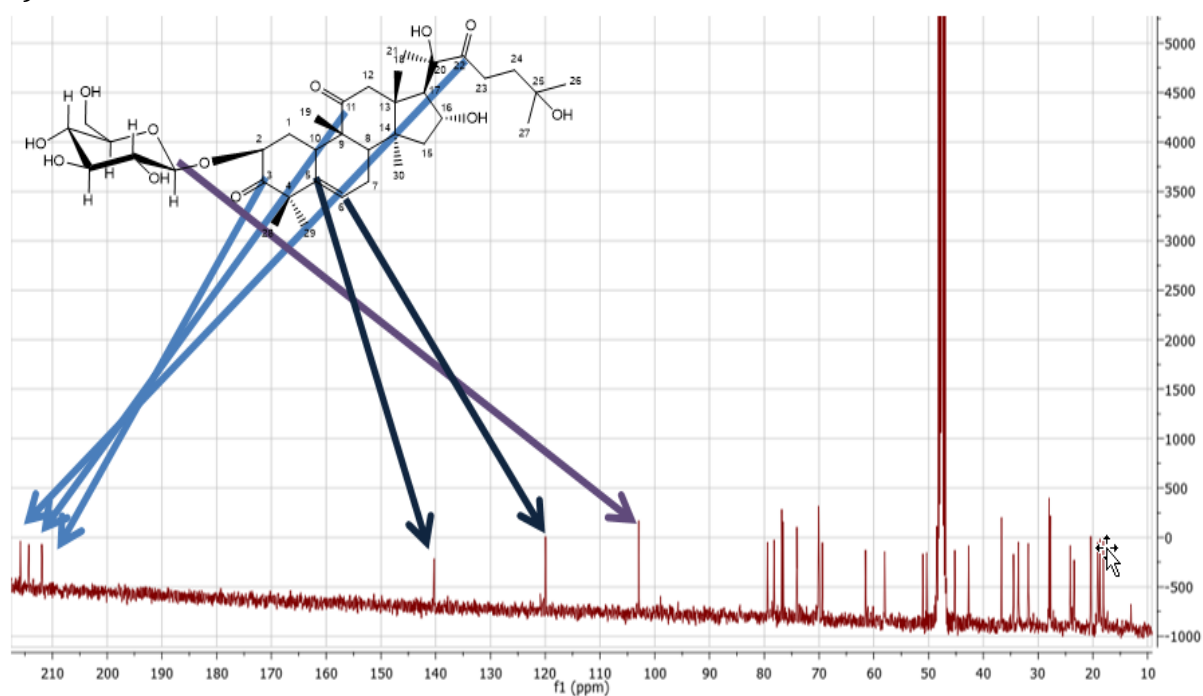


Anexo II. Espectro de RMN de la 2,16-diacetil 23, 24- dihidrocucurbitacina D (3). A) Espectro de RMN de ¹H de 3. B) Espectro de RMN de ¹³C de la 3.

A)

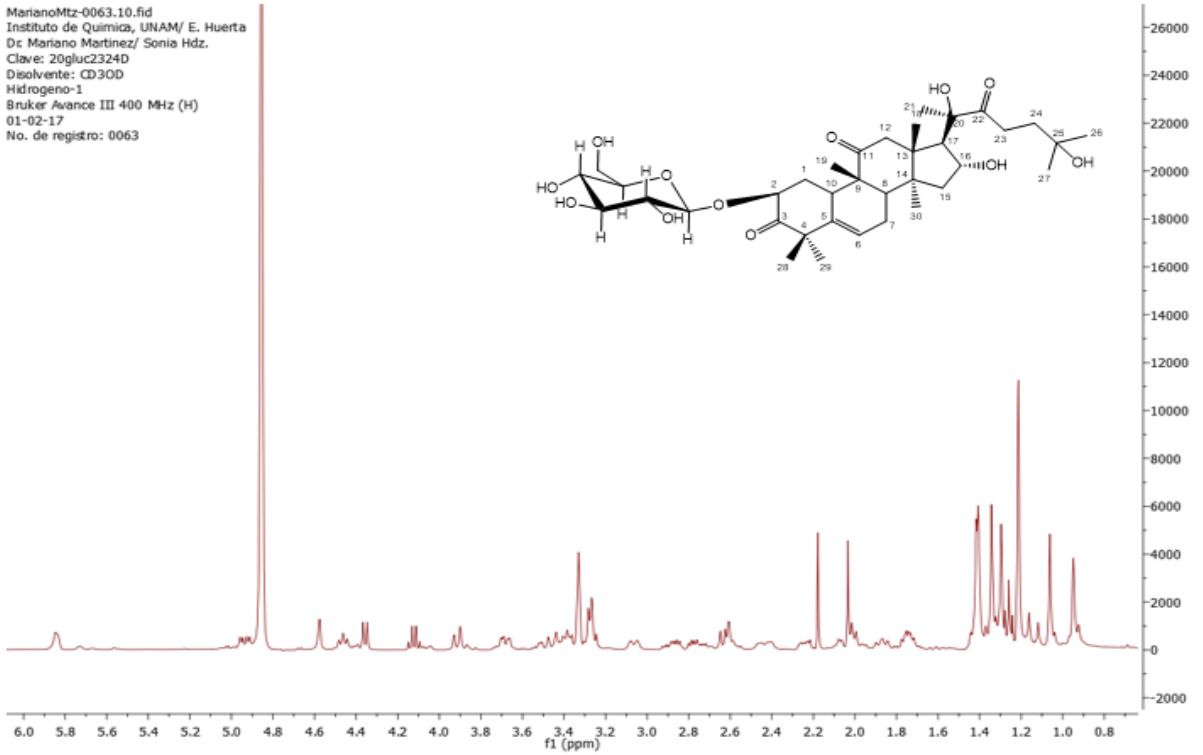


B)

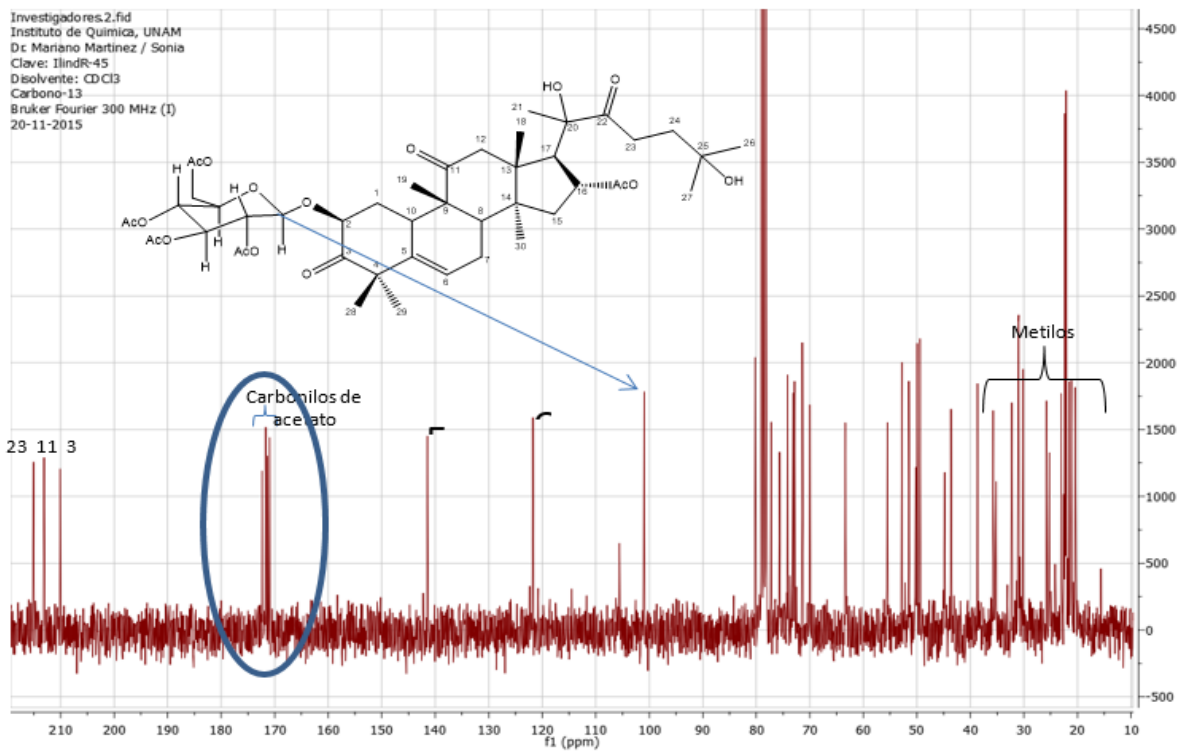


Anexo III. Espectro de RMN de la 2-O-β glucopiranosil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (2). A) Espectro de RMN de ^1H de la 2. B) Espectro de RMN de ^{13}C de la 2.

A)



B)



Anexo IV. Espectro de RMN de la 2-O- β - (2', 3', 4', 6' tetracetil) glucopiranosil, 16 acetil 23, 24-dihidrocucurbitacina D (4). A) Espectro de RMN de ^1H de la 4. B) Espectro de RMN de ^{13}C de la 4.