

MISCELÁNEA  
**CIENTÍFICA**  
EN MÉXICO



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.

# EDITORAS

CRISTINA E. SOLANO SOSA  
MARÍA EUGENIA SÁNCHEZ MORALES  
GLORIA VERÓNICA VÁZQUEZ GARCÍA  
AMALIA MARTÍNEZ GARCÍA  
EVA LILIANA RAMOS GUERRERO

ISBN OBRA COMPLETA  
MISCELÁNEA CIENTÍFICA EN MÉXICO



ISBN TOMO I  
BIOLOGÍA Y QUÍMICA



ISBN TOMO II  
BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS



ISBN TOMO III  
CIENCIAS SOCIALES



ISBN TOMO IV  
FÍSICO MATEMÁTICAS Y CIENCIAS DE LA TIERRA



ISBN TOMO V  
HUMANIDADES, CIENCIAS DE LA CONDUCTA  
Y DIVULGACIÓN CIENTÍFICA



ISBN TOMO VI  
INGENIERÍA



ISBN TOMO VII  
MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD



ISBN Obra Completa  
Miscelánea Científica en México



ISBN Tomo 1  
Biología y Química



ISBN Tomo II  
Biotecnología y Ciencias Agropecuarias



ISBN Tomo III  
Ciencias Sociales



ISBN Tomo IV  
Físico Matemáticas y Ciencias de la Tierra



ISBN Tomo V  
Humanidades, Ciencias de la Conducta y Divulgación Científica



ISBN Tomo VI  
Ingeniería



Tomo VII  
Medicina y Ciencias de la Salud



MISCELÁNEA  
**CIENTÍFICA**  
EN MÉXICO



**TOMO VII**

**MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD**



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.

# EDITORAS

CRISTINA E. SOLANO SOSA  
MARÍA EUGENIA SÁNCHEZ MORALES  
GLORIA VERÓNICA VÁZQUEZ GARCÍA  
AMALIA MARTÍNEZ GARCÍA  
EVA LILIANA RAMOS GUERRERO

ISBN OBRA COMPLETA  
MISCELÁNEA CIENTÍFICA EN MÉXICO



ISBN TOMO VII  
MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD



## EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO, CITOTÓXICO Y OXIDANTE DEL JUGO LIOFILIZADO DE *CUCÚRBITA FICIFOLIA* EN MODELO MURINO

Clara Luz Galván Moreno<sup>1</sup>, Gabriela Morales Velázquez<sup>2</sup>, Ana Lourdes Zamora Perez<sup>2</sup>, Rosalinda Gutiérrez Hernández<sup>1</sup>, Claudia Araceli Reyes Estrada<sup>1</sup>, Marisol Galván Valencia<sup>1</sup> y Blanca Patricia Lazalde Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Zacatecas, México; <sup>2</sup>Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Guadalajara, Jalisco, México.  
clara.galvanmoreno@gmail.com

### RESUMEN

Los metabolitos secundarios de las plantas son los encargados de los efectos farmacológicos y toxicológicos de las mismas. *Cucúrbita ficifolia* es una planta perenne, trepadora y monoica, perteneciente a la familia de las cucurbitáceas, ampliamente usada en la medicina tradicional por sus efectos antiinflamatorios, hipolipemiantes, hipoglicemiantes y antihelmínticos. Sin embargo, no existen reportes de su seguridad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto genotóxico, citotóxico y oxidante de *C. ficifolia* *in vivo*. Se formaron 5 grupos experimentales de ratones machos jóvenes de la cepa Balb-C (n=5), las dosis evaluadas del jugo liofilizado de *C. ficifolia* fueron 500, 1000 y 2000 mg/kg, las administraciones fueron diarias, durante cinco días por vía oral, como control negativo se utilizó agua inyectable y control positivo (ciclofosfamida). Se tomaron frotis de sangre periférica a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, los cuales fueron fijados con etanol y teñidos con naranja de acridina. La citotoxicidad se evaluó mediante el decremento de la proporción de EPC (eritrocitos policromáticos) y la genotoxicidad mediante el incremento del número de EPMN (eritrocitos policromáticos micronucleados) y EMN (eritrocitos micronucleados) mediante microcopia de fluorescencia. Después de las 120h los animales fueron sacrificados y se extrajo el hígado y riñón con los cuales se realizó un homogenizado al 10% en KCl, posteriormente las muestras fueron analizadas mediante ensayo de lipoperoxidación. El análisis de los datos se realizó mediante el software SPSS Statistics V.20. El control positivo mostro daño genotóxico y citotóxico, mientras que los grupos que recibieron las diferentes dosis de *C. ficifolia*, así como el control negativo, no mostraron daño citotóxico y/o genotóxico. En relación al daño oxidativo, *C. ficifolia* a la dosis de 500 y 100 mg/kg mostro un incremento estadístico de la oxidación hepática en relación al control negativo en contraste la dosis de 500 mg/kg del jugo liofilizado de *C. ficifolia* decremента significativamente la oxidación renal con respecto al control positivo. Nuestros resultados muestran que el extracto liofilizado del jugo de la fruta de *C. ficifolia* no presenta efecto citotóxico ni genotóxico en sangre periférica de ratón, pero si presenta efecto oxidante a nivel hepático y antioxidante a nivel renal.

### INTRODUCCIÓN

El planeta cuenta con una gran biodiversidad vegetal ya que más de 7000 especies de plantas se utilizan como alimento o en la terapéutica (Tim, 2012).

El uso de las plantas como agentes terapéuticos, ha sido una práctica desde la antigüedad, los medicamentos de origen vegetal representan una alternativa importante para un gran número de culturas a nivel mundial, debido a las condiciones económicas actuales (Araújo et al., 2016; Gilani & Atta-ur-Rahman, 2005)

Las plantas medicinales poseen la capacidad de producir una gran variedad de moléculas con funciones de defensa frente a depredadores, tales moléculas son llamadas metabolitos secundarios (Ávalos, A. y Pérez, 2009; Fortis-Barrera et al., 2013a), los cuales ejercen una gran variedad de efectos fisiológicos en los seres humanos (Makkar, H. et al., 2007), además de ser de bajo costo y fácil acceso, siendo una alternativa medicinal (Pelkonen et al., 2017; Rahman et al., 2016).

Existe la idea errónea de que por ser de origen vegetal, las plantas no son perjudiciales para la salud, sin embargo, las plantas contienen gran diversidad de compuestos activos que no solo tienen efectos benéficos, sino que además, pueden funcionar como venenos, pesticidas, o teratógenos, provocando que no todas las plantas sean seguras, o su seguridad dependerá de la dosis utilizada (Alamgir, 2017).

En los últimos años se ha demostrado que muchas plantas usadas en la medicina tradicional, o inclusive como alimento pueden dañar la salud del ser humano generando efectos tóxicos, mutagénicos, cancerígenos entre otros, por lo cual se ha generado un creciente interés en la investigación de plantas y su seguridad, mediante estudios toxicológicos tanto in vitro como in vivo (Fennell et al., 2004; Goncharov et al., 2007).

Para determinar la actividad benéfica o toxica de plantas medicinales, nutraceuticos y otros agentes de prueba, se deben fomentar las pruebas que examinen los efectos difíciles o imposibles de detectar clínicamente. Entre las pruebas propuestas figuran las de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad reproductiva.(Arango, 2012; Goncharov et al., 2007; Kakkar & Jaffery, 2005).

*Cucúrbita ficifolia* es una planta perenne, trepadora y monoica perteneciente a la familia de las cucurbitáceas (Lim, 2012), distribuida ampliamente en américa central y américa del sur, ampliamente usada en la medicina tradicional mexicana gracias a sus propiedades como antihelmíntico, antiinflamatorio, antioxidante, antihipertensivo, inmuno-protector, mejorador de fertilidad e hipoglucemiante(Aristatile & Alshammari, 2017; Vega-Avila et al., 2009), además, de ser utilizada en el tratamiento de fiebre, hemorroides y heridas(Alarcon-Aguilar et al., 2002), siendo su efecto hipoglucemiante el más estudiado en modelos animales, hasta su verificación en pacientes con *diabetes mellitus*.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto genotóxico, citotóxico y oxidante del jugo liofilizado de *C. ficifolia* en modelo murino como parte de su seguridad.

## TEORÍA

*C. ficifolia* es una planta domesticada, de la familia de las cucurbitáceas cuyos nombres comunes, dependiendo de su localización, suelen ser: chilacayote, lacayote, calabaza de cabellos de ángel, tzilacayote, calabaza de hoja de parra, pepo, calabaza de verano, entre otros (Aristatile & Alshammari, 2017; Lim, 2012).

A partir del año 2001 se describieron los posibles mecanismos mediante los cuales *C. ficifolia*, tiene efectos antioxidantes. Estos estudios arrojaron que el D-chiro-inositol genera un aumento en el contenido de la enzima Glutación peroxidasa, lo cual se refleja en una disminución en el radio GSH-GSSG (Glutación-Di sulfuro de glutación) ya que, GSH es el principal antioxidante intracelular, esto analizado en ratones obesos y en adipocitos(Acosta-Patiño et al., 2001; Fortis-Barrera et al., 2013b) Por último, en el año 2017, otro estudio que comparo la actividad antioxidante de *C. ficifolia* y *Cucúrbita mostacha*, después de probar un nuevo método de secado a base de radiación con microondas, demostró que los compuestos responsables de la posible acción antioxidante de estas dos *Cucurcubitaceas* se debe principalmente al contenido de polifenoles de las mismas (Nawirska-Olszańska et al., 2017).

Por otra parte, la información toxicológica de *C. ficifolia* ha sido evaluada a partir del año 2002. La dosis letal cincuenta (DL<sub>50</sub>) del jugo liofilizado de *C. ficifolia* en rata fue reportada por Hernández y colaboradores, siendo la dosis de 3,689 mg/kg por vía oral y de 754 mg/kg por vía intraperitoneal, los signos y síntomas que presentaron los animales fueron hipotermia, aumento de viscosidad en sangre y retorcimiento corporal(Hernandez-Galicia et al., 2002).

También se describió el efecto citotóxico in vitro del jugo liofilizado de *C. ficifolia* a la dosis de 8.85 µg/ml sobre células de cáncer mamario (Vega-Ávila, et al., 2009), así como de los extractos metanólico y hexánico de *C. ficifolia* en células madre mesenquimales de medula ósea (hMSCs) a partir de la dosis de 0.7 µg/ml para el extracto hexánico y de 50 µg/ml para el extracto metanólico (Aristatile & Alshammari, 2017).

## PARTE EXPERIMENTAL

Obtención del extracto liofilizado del jugo del fruto *Cucúrbita ficifolia*.

Se obtuvo el jugo del mesocarpio del fruto mediante un extractor de la marca TURMIX, posteriormente fue filtrado al vacío a través de un filtro con poro de 0.2 µm y congelado para posteriormente ser liofilizado.



#### Animales de estudio.

Se utilizaron 25 ratones, de la cepa Balb-C, machos, adultos de 3 meses de edad, clínicamente sanos, los cuales fueron colocados en jaulas de policarbonato con agua y alimento (Harlan Teklad Lab Blocks) ad libitum. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio Claude Bernard del Área de Ciencias de la Salud, UAZ-Siglo XXI, de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Los animales fueron tratados de acuerdo con los reglamentos y Normas como la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

#### Grupos experimentales y tratamientos

Para determinar el efecto genotóxico y/o citotóxico del jugo del fruto de *C. ficifolia* se formaron aleatoriamente 5 grupos experimentales, con 5 animales cada uno (tabla 4). Las administraciones se realizaron con cánula esofágica. El volumen de administración fue de 0.1ml/ 10g de peso. Se utilizó un control negativo, como indicador de que la variable de manipulación, no incrementa el número de micronúcleos y un grupo como control positivo, como indicador del efecto micronucleogénico de un compuesto conocido.

Tabla 1. Grupos experimentales y tratamientos

Compuesto	Dosis	Tiempo de administración
Ciclofosfamida (C+)	30mg/kg	Cada 24h/2 días
Agua (C-)	-----	Cada 24h/ 5 días
Dosis baja jugo liofilizado	300 mg/kg	Cada 24h/ 5 días
Dosis media jugo liofilizado	400 mg/kg	Cada 24h/ 5 días
Dosis alta jugo liofilizado	500 mg/kg	Cada 24h /5 días

(C+): Control positivo; (C-): control negativo.

#### Obtención de muestras biológicas

Se obtuvo una gota de sangre de cada uno de los animales de los grupos de la tabla 1 a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120h, de la punta de la cola de los organismos, se realizaron extendidos por duplicado de cada muestra sobre portaobjetos limpios y desengrasados los cuales estaban codificados. Una vez cumplido el tratamiento (tomada la muestra de las 120h), se procedió a abrir la cavidad abdominal para la obtención de muestra sanguínea de la cavidad ventricular derecha del corazón, para lo cual, se anestesió al animal y se cercioró que no presente estímulos dolorosos, posteriormente se diseccionó el riñón e hígado para su procesamiento.

#### Ensayo de micronúcleos en sangre periférica

Los frotis de sangre se fijaron en metanol durante 10 minutos y se tiñeron con naranja de acridina, tinción específica para ácidos nucleicos (Heddle et al., 1978; Hayashi et al., 1983) y dado que los MN están formados de ADN, estos se tiñen de color amarillo o verde brillante, mientras que el citoplasma en el caso de los eritrocitos normocromáticos o eritrocitos maduros se tiñe de verde opaco semitransparente y en el caso de los EPC o eritrocitos jóvenes el citoplasma se tiñe de rojo por la presencia de ARN. Se contó el número de eritrocitos micronucleados (EMN) en 10, 000 eritrocitos (ET), el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) y el número de EPC en 1000 ET

#### Evaluación del estrés oxidativo.

La determinación de la lipoperoxidación hepática y renal se realizó mediante la técnica modificada de Uchiyama & Mihara, 1978.

Se realizó un homogenizado de hígado o riñón al 10% en cloruro de potasio al 1.15%, el cual fue filtrado sobre gasa. Se tomó una alícuota de 0.5 ml, la cual se colocó en un tubo de ensaye y se le adicionó 3mL de ácido fosfórico y 1 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.6 %, el tubo fue mezclado mediante vortex, posteriormente, el tubo se puso en un baño de agua a ebullición durante 45min, transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se le adicionó 3mL de 1-butanol, se mezcló durante 20 minutos y se separó las fases mediante centrifugación a 2500rpm durante 10

minutos. La fase butanólica se leyó a 535nm. Para poder llevar a cabo la determinación de la concentración de MDA se preparó una curva de calibración a partir de una solución madre de MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane)

#### Análisis estadístico

Los resultados se muestran como promedio más/menos desviación estándar, las comparaciones se realizaron entre cada grupo y su respectivo valor basal (0 horas), mediante el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y se empleó la prueba de ajuste de Bonferroni para múltiples comparaciones post hoc.

### RESULTADOS

El jugo liofilizado del fruto de *C. ficifolia* obtenido presentó una coloración café, y un olor y sabor dulce. El porcentaje de rendimiento fue del 3.26 %.

La citotoxicidad de extracto liofilizado del jugo del fruto de *C. ficifolia* se determinó mediante el decremento en el número del EPC lo cual nos indica una depresión de la medula ósea (Krishna & Hayashi, 2000), y el daño genotóxico mediante el incremento en el número de EPCMN y EMN (Schmid 1975, Hayashi 2000). En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del número de EPC, EPCMN y EMN en los grupos de estudio a los diferentes tiempos de muestreo.

Como se observa en la tabla, el grupo que recibió ciclofosfamida (control positivo) mostro un decremento de la proporción de EPC estadísticamente significativo desde las 72 a las 120 h, en relación al valor basal (0 horas). De igual manera, incrementó en el número de EPCMN (desde las 24 hasta las 120h) y el número de EMN (desde las 72h a las 120h) en relación al valor basal, por lo que la ciclofosfamida es citotóxica y genotóxica a la dosis evaluada.

En el grupo control negativo (agua), no mostro diferencia estadísticamente significativa en relación al valor basal en la proporción de EPC, EPCMN y EMN como era de esperarse ya que este grupo es solo de manipulación. De igual manera, los grupos que recibieron las diferentes dosis del jugo liofilizado de *C. ficifolia* no mostraron diferencia estadísticamente en la proporción de EPC, EPCMN y EMN en relación al valor basal (tabla 2)

	Tiempo de muestreo					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<b>EPC/1000 ET</b>						
Agua	83. 0±32.31	71. 4±33.73	82. 6±16.74	95. 4±26.84	73. 2±31.8	59. 2±19.25
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
Ciclofosfamida	47. 8±14.3	46. 0±13.71	20. 8±10.73	12. 0±10.44	9.2 ±6.79	16. 8±9.88
valor p		ns	ns	0.0 05	0.0 08	0.0 45
<i>C. ficifolia</i> (2000 mg/Kg)	48. 6±18.7	43. 2±11.87	49. 2±12.31	48. 6±16.47	48. 2±9.01	48. 2±11.69
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
<i>C. ficifolia</i> (1000 mg/Kg)	46. 4±9.78	42. 0±11.87	34. 0±5.33	37. 4±7.12	28. 8±17.29	38. 2±3.83
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
<i>C. ficifolia</i> (500 mg/Kg)	47. 4±20.76	35. 8±9.98	37. 2±8.34	31. 8±5.89	41. 4±8.84	39. 6±8.14
valor p		ns	ns	ns	ns	ns

EPCMN/1000 EPC						
Agua	7.6 ±2.19	5.2 ±0.83	8.8 ±3.19	6.6 ±3.36	7.2 ±1.30	5.8 ±1.78
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
Ciclofosfamida	6.2 ±4.14	48 ±17.08	62. 6±20.5	34. 8±10.03	16. 4±9.55	20. 8±6.53
valor p		0.0 00	0.0 00	0.0 00	0.0 41	0.0 01
C. ficifolia (2000 mg/Kg)	4.2 ±2.16	4.4 ±1.94	5.8 ±3.11	4.8 ±2.38	8.2 ±5.26	5.4 ±2.96
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
C. ficifolia (1000 mg/Kg)	5.0 ±1.58	5.4 ±1.51	3.4 ±2.60	5.2 ±1.64	4.8 ±3.76	12. 4±10.45
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
C. ficifolia (2000 mg/Kg)	3.6 ±1.51	4.6 ±2.70	4.8 ±2.58	6.4 ±3.78	4.4 ±1.67	5.2 ±2.48
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
EMN/10,000 ET						
Agua	26. 6±9.15	24. 8±6.05	20. 6±8.67	25. 6±4.27	27. 8±3.03	31. 2±7.39
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
Ciclofosfamida	37. 4±9.44	42. 4±13.18	64. 8±22.0	43. 6±25.11	71. 4±36.94	64. 2±21.71
valor p		ns	ns	0.0 01	0.0 08	0.003
C. ficifolia (1000 mg/Kg)	38. 6±16.71	35. 8±11.25	35. 4±16.16	33.8±10.9 1	44. 6±12.89	29±8.94
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
C. ficifolia (2000 mg/Kg)	38. 6±8.32	36.8±4.65	37. 2±9.17	35.8±7.59	36.6±16.8 3	39±8.71
valor p		ns	ns	ns	ns	ns
C. ficifolia (500 mg/Kg)	27. 8±6.41	32.4±7.66	35. 4±2.19	40.6±10.1 3	34.8±8.37	34.4±8.7 1
valor p		ns	ns	ns	ns	ns

Tabla 2. Proporción de EPC, EPCMN y EMN en los grupos de estudio a los diferentes tiempos de muestreo

Los resultados están expresados como promedio ± desviación estándar. Las comparaciones se hicieron en cada grupo y su respectivo valor basal (0h), mediante el análisis de varianza (ANOVA) para medias repetidas y se empleó la prueba de ajuste de Bonferroni para múltiples comparaciones post hoc, se consideró estadísticamente significativo cuando P<0.05. EPC: Eritrocitos policromáticos; ET: Eritrocitos totales; ns: no significativos.

Evaluación de estrés oxidativo hepático y renal.

Los resultados de la lipoperoxidación hepática y renal se muestran en la figura 2.

El grupo de animales que recibieron la dosis de 500 y 1000 mg/kg del jugo liofilizado de *C. ficifolia* mostraron las mayores concentraciones de MDA a nivel hepático. El grupo que recibió la dosis de 500 mg/kg del jugo liofilizado de *C. ficifolia*, mostro concentraciones de MDA estadísticamente mayores que las del grupo que recibió ciclofosfamida. De igual manera el grupo que recibió la dosis de 100 mg/kg del jugo liofilizado de *C. ficifolia*, mostro concentraciones de MDA estadísticamente

mayores que las del grupo que recibió ciclofosfamida, agua y la dosis de 2000 mg/kg del jugo liofilizado de *C. ficifolia*

En relación a la peroxidación renal, el grupo que recibió la dosis de 500 mg/kg del jugo liofilizado de *C. ficifolia* mostro una menor concentración de MDA en relación al grupo que recibió agua (control negativo) y al que recibió la dosis de 2000 mg/Kg de jugo liofilizado de *C. ficifolia*.

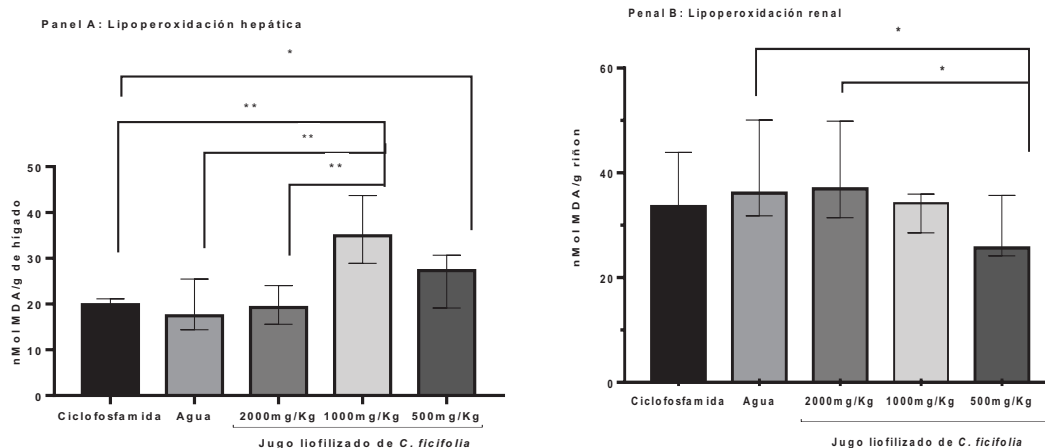


Figura 2. Resultados de la lipoperoxidación hepática y renal en los grupos de estudio. Panel A: Lipoperoxidación hepática; Panel B: Lipoperoxidación renal; nMol: nano mol; MDA: malondialdehído; g: gramos; mg: miligramos; Kg: kilogramos; \* $p=0.05$ ; \*\* $p=0.001$

## CONCLUSIONES

El extracto liofilizado del jugo de la fruta de *C. ficifolia* no presenta citotoxicidad ni genotoxicidad in vivo. Las dosis de 500 y 1000mg/kg del jugo liofilizado de *C. ficifolia* incrementan la oxidación a nivel hepática y disminuyen la oxidación a nivel renal en relación al control.

## REFERENCIAS.

- Acosta-Patiño, J. L., Jiménez-Balderas, E., Juárez-Oropeza, M. A., & Díaz-Zagoya, J. C. (2001). Hypoglycemic action of Cucurbita ficifolia on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 99–101. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00272-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00272-0)
- Alamgir, A. N. M. (2017). Progress in Drug Research, Volume 73: Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1: Pharmacognosy. In *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1* (Vol. 1, pp. 295–353). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63862-1>
- Alarcon-Aguilar, F. J., Hernandez-Galicia, E., Campos-Sepulveda, A. E., Xolalpa-Molina, S., Rivas-Vilchis, J. F., Vasques-Carrillo, L. I., & Roman-Ramos, R. (2002). Evaluation of the hypoglycemic effect of Cucurbita ficifolia Bouche (Cucurbitaceae) in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 185–189. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00176-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00176-9)
- Arango, S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana Biomarkers for the evaluation of human health risks. *Facultad Nacional de Salud Pública, Antiquía, Colombia.*, 30, 75–82.
- Araújo, T. A. de S., Joabe Gomes de Melo, W. S. F. J., & Albuquerque, U. P. (2016). Introduction to Ethnobiology. *Introduction to Ethnobiology*, 1–310. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-28155-1>
- Aristatile, B., & Alshammari, G. M. (2017). In vitro biocompatibility and proliferative effects of polar and non-polar extracts of cucurbita ficifolia on human mesenchymal stem cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 215–220.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.023>
7. Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)*, *REDUCA (Biología)*, 2(3), 119–145. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
  8. Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. In *Life Sciences* (Vol. 78, Issue 5, pp. 431–441). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>
  9. Fennell, C. W., Lindsey, K. L., McGaw, L. J., Sparg, S. G., Stafford, G. I., Elgorashi, E. E., Grace, O. M., & Van Staden, J. (2004). Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*(2–3), 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.012>
  10. Fortis-Barrera, Á., Alarcón-Aguilar, F. J., Banderas-Dorantes, T., Díaz-Flores, M., Román-Ramos, R., Cruz, M., & García-Macedo, R. (2013a). Cucurbita ficifolia Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*(10), 1563–1576. <https://doi.org/10.1111/jphp.12119>
  11. Fortis-Barrera, Á., Alarcón-Aguilar, F. J., Banderas-Dorantes, T., Díaz-Flores, M., Román-Ramos, R., Cruz, M., & García-Macedo, R. (2013b). Cucurbita ficifolia Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*(10), 1563–1576. <https://doi.org/10.1111/jphp.12119>
  12. Gilani, A. H., & Atta-ur-Rahman. (2005). Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1–2), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.001>
  13. Goncharov, N., Sobolev, V., Terpilowski, M., Ekaterina, K., & Jenkins, R. (2007). Nutraceuticals in veterinary medicine. *Pharmaceutical Journal*, *278*(7434), 51–55. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8>
  14. Hernandez-Galicia, E., Campos-Sepulveda, A. E., Alarcon-Aguilar, F. J., Vazquez-Carrillo, L. I., Flores-Saenz, J. L., & Roman-Ramos, R. (2002). Acute toxicological study of Cucurbita ficifolia juice in mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, *45*(February), 42–43.
  15. Kakkar, P., & Jaffery, F. N. (2005). Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *19*(2), 335–349. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.09.003>
  16. Krishna, G., & Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *455*(1–2), 155–166. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00117-2)
  17. Lim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 4, Fruits. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*, *1*, 1–1022. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2>
  18. Makkar, H. P., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Plant secondary metabolites (pp. 101–106). Totowa, NJ, USA: Humana Press.
  19. Nawirska-Olszańska, A., Stępień, B., & Biesiada, A. (2017). Effectiveness of the fountain-microwave drying method in some selected pumpkin cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.067>
  20. Pelkonen, O., Duez, P., Vuorela, P. M., & Vuorela, H. (2017). Toxicology of herbal products. *Toxicology of Herbal Products*, 1–3. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43806-1>
  21. Rahman, I. M. M., Begum, Z. A., Yahya, S., Lisar, S., Motafakkerzad, R., & Cell, A. S.-P. (2016). *Complimentary Contributor Copy* (Issue July).
  22. Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutation Res.*, *31*, 9-15.
  23. Tim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 4, Fruits. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*, *2*, 1–1022. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2>
  24. Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, *86*(1), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
  25. Vega-Avila, E., Espejo-Serna, A., Alarcón-Aguilar, F., & Velasco-Lezama, R. (2009).

Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 52(June 2014), 78–82.