

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"
Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras"

EFECTO DEL EXTRACTO HIPOGLICEMIANTE DE *PETIVERIA ALLIACEA* L SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA POR LOS ERITROCITOS

Dra. Delia Rojo Domínguez, Dr. Luis Bell Heredia, Dra. Elena Cancio Martínez y Dr. Roberto Iglesias Lores

RESUMEN

Se estudió el efecto de un extracto hipoglicemiante de *Petiveria alliacea* L sobre el consumo de glucosa por los eritrocitos de donantes voluntarios sanos. Los eritrocitos se incubaron con una dilución de sheilina de 1 UD/10 mL durante 4 h y se determinó la concentración de glucosa a los tiempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min. Para determinar si había efecto dosis respuesta se incubaron los eritrocitos con dosis crecientes de sheilina (0, 0,5, 1, 5, 10 y 15 U/10 mL). Se obtuvo que la sheilina no afecta el consumo de glucosa por los eritrocitos ni a dosis elevadas. Estos resultados sugieren que la acción del producto no afecta el transportador de glucosa (glut 1) ni la fase anaerobia de la glicólisis, por lo que su acción hipoglicemiante parece estar ligada a la acción de la insulina.

DeCS: PLANTAS MEDICINALES; EXTRACTOS VEGETALES/uso terapéutico; ERITROCITOS/metabolismo; DIABETES MELLITUS/quimioterapia; DIABETES MELLITUS/efecto de drogas; AGENTES HIPOGLUCÉMICOS/uso terapéutico.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica e incurable, que afecta a más de 30 000 000 de personas en el mundo. Esta enfermedad es responsable de innumerables decesos por sus graves y frecuentes complicaciones y está dentro de las primeras causas de muerte en la población adulta. Para mejorar los niveles de salud de la población, el gobierno cubano destina anualmente más de 5 000 000 de dólares, solamente en la atención al paciente diabético.

A través de los años se han estudiado y ensayado gran número de productos hipoglicemiantes extraídos de fuentes diversas.¹⁻³ Entre ellos se ha confirmado la acción hipoglicemiante de numerosas plantas, en modelos experimentales y en pacientes diabéticos, aunque se conoce muy poco del mecanismo específico de acción.⁴⁻²⁰

El doctor *Roberto Iglesias* y otros, obtuvieron un extracto de *Petiveria alliacea* L, que demostró tener un poderoso

efecto hipoglicemiante, al que denominaron sheilina²¹. Ellos demostraron que este producto ejerce una acción importante sobre la membrana del eritrocito que provoca un incremento de la unión de la insulina a su receptor de membrana. El metabolismo intermediario de los eritrocitos es muy simple pues ha perdido organitos tan importantes como el núcleo y las mitocondrias. Es por ello que en el hematíe la principal fuente de energía está representada por la glicólisis anaerobia, a partir de la cual se obtiene el ATP necesario fundamentalmente para posibilitar los mecanismos de transporte activo al nivel de la membrana.

Existen reportes de productos que actúan sobre la membrana celular y provocan la activación de los transportadores de glucosa. En los eritrocitos el transportador de glucosa (glut1) es el responsable de la entrada de glucosa a la célula y su acción es independiente de la insulina. En el presente trabajo se estudió el efecto de la sheilina

sobre el consumo de glucosa por los eritrocitos para determinar si además de su acción ligada al mecanismo de acción de la insulina ejerce algún efecto sobre el transportador de glucosa o sobre la fase anaerobia de la glicólisis, para contribuir a esclarecer su mecanismo de acción²²⁻²³

MÉTODOS

Eritrocitos: Se obtuvieron de donantes voluntarios sanos, de los 2 sexos, que no tuvieran antecedentes de diabetes mellitus como elemento de exclusión.

Glucosa: D-glucosa. AnalaR. BDH Chemicals Ltd Poole, England

Sheilina: Extracto de *Petiveria alliacea* L²⁴. Se realizó una caracterización espectrofotométrica de la fracción I por barrido espectral en el rango de bandas de 200 a 600 nm de longitud de ondas (fig 1). Se asumió que 1UD de sheilina es la masa de sheilina diluida en 10 mL de agua que absorbe una DO de 0,1 a 210 nm (fig. 1)

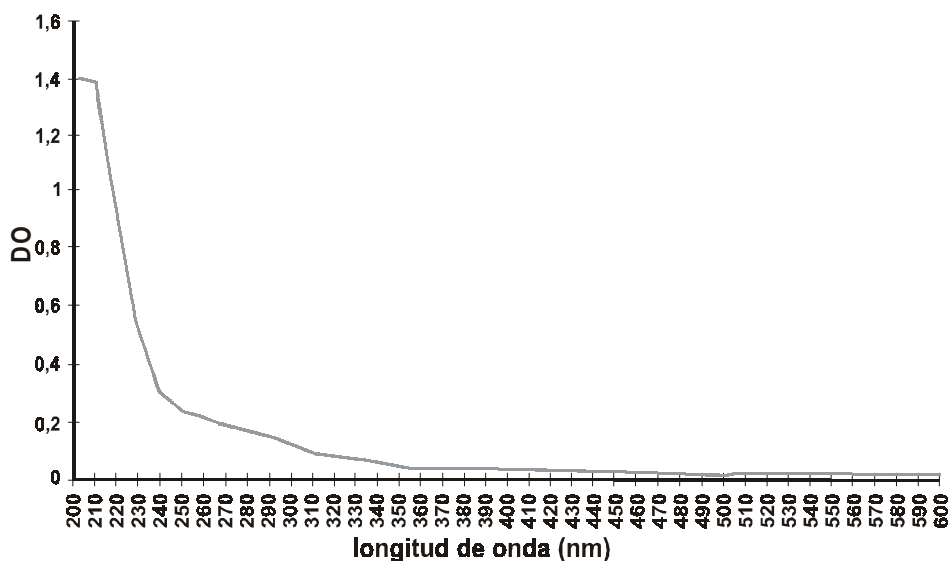


Fig. 1. Caracterización espectrofotométrica de la sheilina.

Obtención de eritrocitos: Se obtuvieron según la técnica de Boyum²⁵ que describen Gambhir y otros. Se recogieron 10 mL de sangre en tubos previamente heparinizados (Heparina 500 UI/mL, IMEFA, Cuba) y se centrifugaron a 400 g durante 10 min a 10 °C. El plasma se decantó. El precipitado celular se resuspendió en solución salina hasta completar volumen (NaCl a 0,9 %, IMEFA, Cuba). Luego se adicionaron suavemente 6 mL de esta mezcla a 3 mL de Ficoll-Hypaque (densidad 1,077 g/mL, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Se centrifugó a 400 g a 10 °C. El precipitado se resuspendió en solución salina (v/v) y se centrifugó en iguales condiciones. Finalmente el precipitado se resuspendió en un volumen necesario de tampón G (Hepes 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM, CaCl₂ 10 mM, Dextrosa 10 mM, NaCl 50 mM, KCl 5 mM, BSA 1 %, pH: 8,0 y osmolaridad igual a 286 miliosmol/L) para una concentración de 4,5 x 10⁹ células/mL. El conteo celular se realizó en un contador celular modelo Sysmex F-800. La viabilidad celular fue de más de 98 %, determinada por la técnica del *Tripan Blue*. A la mezcla se le adicionó glucosa para obtener una concentración alrededor de 5 mM/L.

Estudio del consumo de glucosa por los eritrocitos

Se incubaron 10 mL de la suspensión de eritrocitos a 37 °C durante 4 h en presencia y ausencia de 120 µL de la dilución de sheilina de 1UD/10 mL. Se determinó la concentración de glucosa a los tiempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min por el método de la glucosa oxidasa en un analizador automático de la Boheringer Mannheim modelo Hitachi System 704²⁶. Para el estudio se partió de una cifra de glucosa inicial (tiempo 0) que

oscilara alrededor de 5 mM/L. Se estudiaron los eritrocitos de 10 donantes voluntarios.

Estudio del efecto dosis respuesta de la sheilina en el consumo de glucosa por los eritrocitos

Se incubaron 5 mL de la suspensión de eritrocitos a 37 °C durante 4 h en presencia de 120 µL de la dilución de sheilina a las concentraciones (0, 0,5, 1, 5, 10 y 15 U/10 mL). Se determinó la concentración de glucosa a los tiempos 0, 2 y 4 h por el método de la glucosa oxidasa en iguales condiciones que el experimento anterior.

RESULTADOS

Efecto de la sheilina en el consumo de glucosa por los eritrocitos

Cuando se incubaron los eritrocitos con la sheilina, se encontró como se muestra en la figura 2, que no afecta el consumo de glucosa en este tipo de células. El comportamiento de la curva es similar, tanto en presencia como en ausencia de sheilina.

Efecto dosis-respuesta de la sheilina en el consumo de glucosa por los eritrocitos

Al incubar los eritrocitos con varias dosis de sheilina, se encontró que no hubo modificación en el consumo de glucosa por estos, lo que demuestra que la sheilina ni a elevadas dosis modifica el consumo de glucosa de los eritrocitos. En la figura 3 se observa cómo los valores de glucosa son similares en los 3 tiempos estudiados.

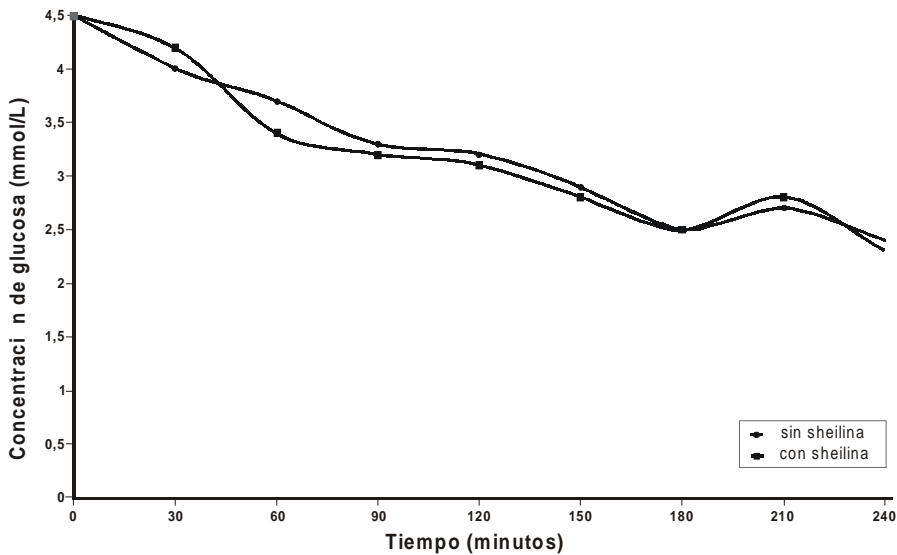


Fig. 2. Efecto de la sheilina sobre el consumo de glucosa por los eritrocitos.

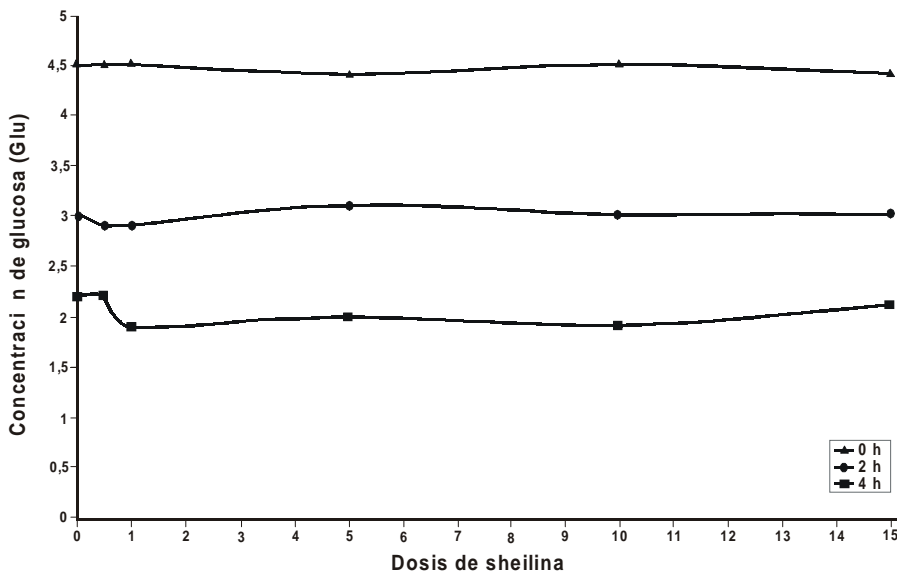


Fig. 3. Efecto de dosis creciente de la sheilina sobre el consumo de glucosa por los eritrocitos.

DISCUSIÓN

En otros estudios realizados en el laboratorio, los autores de este trabajo encontraron que la sheilina ejerce una acción que parece afectar la membrana del

eritrocito en alguno de sus componentes variables (el potencial redox y la fluidez), que provoca incremento de la unión de la insulina y que probablemente puede involucrar los transportadores de glucosa.²⁷ En este estudio no se encontró ninguna

acción de la sheilina en el consumo de glucosa por los eritrocitos, lo que induce a pensar que su acción hipoglicémica no involucra el transportador de glucosa (glut 1). Este resultado apunta a que la acción de la sheilina está relacionada con la acción de la insulina y concuerda con los resultados de las pruebas clínicas preliminares, donde se encontró que se reducían los requerimientos de insulina de los pacientes diabéticos bajo tratamiento con sheilina y con los estudios que

demonstraron que este producto incrementaba la unión de la insulina a su receptor (comunicación personal). Considerando el metabolismo del eritrocito se puede plantear también que la sheilina no afecta la fase anaerobia de la glicólisis.

Se concluye que la sheilina no afecta el consumo de glucosa en los eritrocitos y no lo afecta ni a dosis muy elevadas. Como se observa en la figura 3 los valores de glucosa son similares en los 3 tiempos estudiados.

SUMMARY

The effect of a hypoglycemic extract of *Petiveria alleacea* L on glucose consumption was studied by using the erythrocytes of voluntary healthy donors. The erythrocytes were incubated with a dilution of sheilina of 1 UD/10 mL during 4 hours and the glucose concentration was determined at 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 min. To determine the existence of a dose response effect, the erythrocytes were incubated with increasing doses of sheilina (0, 0.5, 1, 5, 10 and 15 U/10 mL) It was observed that even at elevated doses sheilina does not affect the consumption of glucose by the erythrocytes. These results suggest that the action of the product affects neither the glucose transporter (glut 1) nor the anaerobic phase of glycolysis. That's why its hypoglycemic action seems to be connected with insulin action.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL; PLANT, EXTRACTS/therapeutic use; ERYTHROCYTES/ metabolism; DIABETES MELLITUS/drug therapy; DIABETES MELLITUS/drug effects; HYPOGLYCEMIC AGENTS/therapeutic use.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santos RF. Changes in insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of type 2 diabetes. *Diabete-Metabol* 1995;21(4):274-80.
2. Sacks DB. The activity of calmodulin is altered by phosphorylation: modulation of calmodulin function by the site of phosphate incorporation. *Biochem J* 1995;312:197-204.
3. Dao B Z. Sulphonylurea effects on insulin secretion in islets. *Desensitized to Glucose Pancreas* 1990;5:528-32.
4. Alarconaguilar FJ. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Ethnopharmacol* 1997; 55(3):171-77.
5. Miura T. Hypoglycemic and aldose reductase activity of *Polichia campestris*. *Biol Pharm Bull*, 1996;19 (6):852-54.
6. Marles RJ. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995;2:137-89.
7. Texeira CC. The effect of *Syzygium cumini* (L) skeels on post-prandial blood glucose levels in non-diabetic rats and rats with streptozotocine-induced diabetes mellitus. *Ethnopharmacol* 1997;56(3):209-13.
8. Purusotam B. Bellidifolin stimulates Glucose uptake in Rat1 Fibroblasts and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin (STZ) - induced diabetic rats. *Planta Med* 1995;61:402-5.
9. Shukla R. Hypolipidemic effect of water extract of *Ficus Bengalensis* in Alloxan induced diabetes mellitus in rabbits. *Ind Clin Biochem* 1995;10(2):119-21.

10. Kakuda T. Hipoglycemic effect of extracts from *Langerstroemia speciosa* L. leaves in genetically diabetic KK-A(y) mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60(2):204-8.
11. Murakami M. New hipoglycemic constituents in "gymnemic acid" from *Gymnema sylvestre*. *Chem Pharm Bull* 1996;44(2):469-71
12. Miura T. Hipoglycemic activity and structure-activity relationship of iridoidal glycosides. *Biol Pharm Bull* 1996;19(1):160-1.
13. Elfiky FK Effect of luffa aegyptiaca (seeds) and carissa edulis (leaves) extracts on blood glucose level on normal and streptozotocine diabetic rats. *Ethnopharmacol* 1996;50(1):43-7.
14. Twaij HA. Hypoglycemic activity of artemisia herba alba. *J Ethnopharmacol* 1988;(2-3):123-6.
15. da Silva BP, Parente JP: Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Melocactus depressus*. *Planta Med* 2002 Jan;68(1):74-6.
16. Rodríguez-Concepción M, Pérez-García A, Beltrán JP Up-regulation of genes encoding novel extracellular proteins during fruit set in pea. *Plant Mol Biol* 2001 Jul;46(4):373-82.
17. Mendiola-Olaya E, Valencia-Jimenez A, Valdes-Rodriguez S, Delano-Frier: Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants *Plant Mol Biol* 1998 Dec;38(6):919-27.
18. Labra A: Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000 Jul;126(3):425-33.
19. Rodriguez PL :Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants.
20. Caballero C. Castanera P. Ortego F. Fontana G. Pierro P, Savona G. Rodríguez B. Effects of ajugarins and related neoclerodane diterpenoids on feeding behaviour of *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera exigua* larvae. *Phytochemistry* 2001 Sep;58(2):249-56.
21. Iglesias R, Cires M. *Petiveria alliacea* (anamú). Study of the hypoglycemic effects . *Rev.Rumana.Med.Int* 1990;28(4):347-52.
22. Fumihiko K. Insulin-stimulated glut4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Comm* 1993;195(2):132
23. Fumihico K. Direct demonstration of insulin-induced glut4 translocation to the surface of intact cells by insertion of a c-myc epitope into an exofacial glut4 domain. *J Biol Chem* 1993; 268(19):14523-26.
24. Patente # 213 de 1990. Producto con actividad hipoglicemiente. Método de obtención. Presentada en la ONIITEN.
25. Boyum A. Separation of leucocytes from blood an bone marrow. *Scan J Clin Invest* 1986;21:79-89.
26. Método Glucosa Oxidasa. Boehringer Mannheim; Glucosa GOP-PAP for BM/Hitachi system 704.Boeringer Mannheim GmbH. Diagnostica October 1987 edition 1087-E 7243-L1.1003739.
27. Rojo D, Bell L, Cancio E y Iglesias R Efecto de un extracto hipoglicemiente de *Petiveria alliacea* sobre la unión de la insulina a eritrocitos. *CENIC Cien Biol* 2000;31(3):163-7.

Recibido: 11 de diciembre de 2000.

Aprobado: 5 de abril de 2001.

Dra. *Delia Rojo Domínguez*. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Giron". Avenida 146 y 31, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.