

Evaluación de la expresión del gen GLP-1 (péptido 1 homólogo al glucagón) en ratas inducidas a Diabetes Mellitus tipo 2 tratadas con extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua)

Evaluation of the expression of GLP-1 gen in rats induced to type 2 diabetes treated with methanolic extract of *Schkuhria pinnata* (Canchalagua)

María Alejandra Zúñiga Gutierrez¹, David Delgado Diaz¹, Fredy Zegarra Aragón¹, Jaime A. Yañez², Carlos Arenas Chávez¹, Corina Vera Gonzales³

¹ Universidad Católica de Santa María

² Alcon Laboratories, Inc.

³ Universidad Nacional de San Agustín

Resumen

Se evaluó la expresión del gen GLP-1 en ratas inducidas a Diabetes Mellitus tipo 2 tratadas con extracto metanólico de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua). Inicialmente se indujo la diabetes experimental homóloga a la de tipo 2 en ratas macho *Wistar novergicus* de 4 meses de edad mediante la administración de Estreptozotocina-Nicotinamida, a dosis de 65mg/kg y 330mg/kg respectivamente, confirmándola mediante el monitoreo de la variación de glicemia y estudios histopatológicos en el páncreas de los ejemplares diabéticos. El efecto hipoglucemiante del extracto de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) evaluado durante los 25 días posteriores a la inducción de diabetes experimental, mostró una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en los grupos C, D y E (ratas inducidas a diabetes experimental tipo 2 tratadas con Metformina 330mg/kg, extracto metanólico de Canchalagua a 20 mg/kg y 40 mg/kg, respectivamente) a partir del día 10, llegando a valores normales de glicemia al finalizar el tiempo de estudio. Posteriormente, se evaluó la expresión del gen GLP-1 en el intestino delgado distal de los grupos experimentales mediante qPCR; los resultados mostraron que el grupo de ratas inducidas a diabetes experimental sin tratamiento posterior (grupo B) tuvo una inhibición de la expresión en 41.319 veces con respecto al grupo de ratas no inducidas a diabetes experimental (grupo A), mientras que los grupo C, D y E tuvieron una sobreexpresión de 16.694, 7.292 y 7.761 respectivamente, con respecto al grupo A. Los resultados hallados son consistentes con un moderado efecto del extracto de *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) sobre la expresión del gen GLP-1 y además, un efecto sobre la regeneración de los islotes de Langerhans del páncreas, lo que ayuda a explicar el efecto hipoglucemiante observado.

Descriptor: Diabetes Mellitus tipo 2, *Schkuhria pinnata*, *Wistar novergicus*, Estreptozotocina, Nicotinamida, gen GLP-1, qPCR, Metformina.

Abstract

The expression of GLP-1 gene was evaluated in rats induced to type 2 Diabetes Mellitus and treated with methanol extract of *Schkuhria pinnata* (Canchalagua). In vivo studies were performed. Experimental type 2 diabetes was induced in 4 months age *Wistar novergicus* male rats by administration of Streptozotocin-Nicotinamide (65mg/kg and 330mg/kg), then, diabetes was confirmed by monitoring the glucose variation and histopathology of diabetic's pancreas. The hypoglycemic effect of *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) was evaluated during 25 days after the induction of experimental diabetes, showing a statistically significant decrease ($P < 0.05$) in groups C, D and E (rats induced to type 2 diabetes experimental treated with Metformin 330mg/kg, methanolic extract of Canchalagua a 20 mg/kg y 40 mg/kg, respectively) since day 10, reaching normal values of glycemia at the end of the experiment. Subsequently, the GLP-1 gene expressions were evaluated in the rat distal small intestines by qPCR and the results showed that the group B expression was down-regulated by the factor 41.319 in comparison with the group A (normal rats), the group C, showed an up-regulation with the factor 16.694 compared with group A, and the experimental groups D and E showed expressions up-regulated by the factors 7.292 and 7.761 in comparison with the group A.

Keywords: Type 2 Diabetes, *Schkuhria pinnata*, *Wistar novergicus*, Streptozotocin, Nicotinamide, GLP-1 gen, qPCR, Metformin.

Introducción

La Diabetes Mellitus Tipo 2 es un problema de salud a nivel mundial, algunos investigadores la conocen como principal problema de salud pública en lo que se refiere a las enfermedades crónico degenerativas (Panduro y cols., 2001). Además, se le considera como una pandemia de enormes proporciones, de alto costo social y económico y de magnitudes ascendente (García Peña y cols., 1995). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud hay alrededor de 346 millones de personas diagnosticadas con Diabetes Mellitus Tipo 2 en el mundo, además, se cree que el incremento en los próximos años se acentuara en los países en vías de desarrollo como Asia, África y Latinoamérica. Aproximadamente del total de los enfermos diabéticos, el 85 al 90% presentan diabetes tipo 2, siendo por lo general, pacientes mayores de 40 años u obesos, en quienes se desarrolla paulatinamente la enfermedad y su expresión clínica puede pasar desapercibida por muchos años. ⁽¹⁾

Las plantas son una fuente ejemplar de drogas ya que muchas de las drogas disponibles en la actualidad han sido obtenidas directa o indirectamente de ellas. La información etnobotánica reporta cerca de 800 plantas que pueden poseer potencial antidiabético (Aларcon-Aguilara et al., 1998). Muchas han mostrado actividad antidiabética cuando fueron evaluadas usando técnicas experimentales disponibles en la actualidad (Saifi et al., 1971; Mukherjee et al., 1972; Coimbra et al., 1992; Ajit kar et al., 1999; Jafri et al., 2000). Una amplia gama de principios activos derivados de plantas constituida por numerosos compuestos químicos han demostrado actividad con posible uso en el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2 (Bailey and Day, 1989; Ivorra et al., 1998; Marles and Farnsworth, 1995). En consecuencia, las plantas son una fuente potencial de drogas antidiabéticas, pero este hecho no ha sido validado todavía en la comunidad científica, debido a que las formas alternativas de la medicina no están muy bien definidas. ⁽²⁾

El GLP-1 es una hormona intestinal, con fuerte carácter de incretina tanto en personas normales como en pacientes diabéticos tipo 2, ya que provoca una inmediata respuesta del páncreas a estímulos procedentes de la absorción de alimentos (fundamentalmente azúcares y grasas), en el que estimula la secreción de insulina e inhibe la de glucagón.

Por lo expuesto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivos la evaluación de la expresión del gen GLP-1 en colon de ratas inducidas a diabetes tipo 2 tratadas con extracto metanólico de

Schkurhia pinnata (Canchalagua), así como el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de *Schkurhia pinnata* (Canchalagua).

Experimental (metodología, si el trabajo es netamente teórico)

Preparación del extracto metanólico

Las plantas de *S. pinnata* fueron recolectadas del Distrito de Samegua, Departamento de Moquegua. Primeramente las plantas fueron lavadas e trituradas con nitrógeno líquido e introducidas en metanol absoluto, dejando macerar durante 3 días a agitación constante, oscuridad y a temperatura ambiente. El sobrenadante fue filtrado y concentrado en un rotavapor BüCHI RE 111.

Determinación del Efecto Hipoglucemiante

Se utilizaron 22 ratas machos de laboratorio variedad "Wistar novergicus para la inducción de Diabetes tipo 2, se administró Niacinamida a dosis de 230 mg/kg de peso corporal de rata vía intraperitoneal. Transcurrido 15 minutos, se procedió a administrar Estreptozotocina a dosis de 65mg/kg de peso corporal de rata por vía intravenosa ⁽³⁾. Se realizó dosajes de glucosa en sangre (Basal, Días 1, 5, 10, 15, 20 y 25) previo a un ayuno de 10 horas mediante el método de Dartman ⁽⁴⁾ y se determina la glucosa en sangre utilizando el Método enzimático colorimétrico a través de el Kit Glucose PAP SL del laboratorio ELITech. Se administro el extracto metanólico a concentración de 20mg/kg y 40mg/kg de rata al grupo D y E respectivamente, y Metformina a concentración de 350 mg/kg de rata al grupo C ⁽⁵⁾, mediante una jeringa provista de una sonda metálica.

Tabla 1: Distribución de los grupos experimentales

Grupo	Estado	Tratamiento
A	Normales	Suero Fisiologico
B	Diabeticas	Suero Fisiologico
C	Diabeticas	Metformina 350mg/kg
D	Diabeticas	Extracto metanólico 20mg/kg
E	Diabeticas	Extracto metanólico 40mg/kg

Estudio Histopatológico

Se seleccionó una rata al azar de cada grupo experimental, dándoles muerte y extrayéndoles el páncreas. ⁽³⁾ El tejido pancreático fue colocado en formol al 10% hasta su procesado para histología la

cual fue llevado a cabo en el Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de San Agustín, siendo esta prueba utilizada para la confirmación de Diabetes tipo 2.

Evaluación de la expresión del gen GLP-1

Se recolectaron segmentos de intestino delgado distal de los grupos de trabajo, los cuales fueron introducidos en RNA later y almacenados a -20°C para su posterior uso (6). El aislamiento del RNA total fue llevado a cabo utilizando el protocolo Trizol Reagent y la síntesis de cDNA mediante el Kit SuperScript III Reverse Transcriptase para PCR. La evaluación de la expresión del gen fue llevada a cabo mediante el uso del Kit EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR kits para PCR a tiempo real; utilizando B-actina como control positivo endógeno

tratar de mejorar el estado de salud de estos pacientes son muy variados y van desde productos farmacéuticos elaborados hasta el uso de productos naturales y hábitos alimenticios, dietéticos y deportivos. (8)(9)

El presente estudio evaluó el efecto del extracto de *Schkuhria pinnata* "Canchalagua" sobre la expresión del gen GLP-1 y la variación de los niveles de glicemia en ratas inducidas experimentalmente a un estado homólogo de la diabetes tipo II, siguiendo el protocolo descrito por Amaya-Chávez, Dolores-Ledezma, Álvarez Sánchez y cols., 2006 (3). De acuerdo a los resultados se pudo determinar que la inducción produjo estados hiperglicémicos moderados en todos los grupos experimentales antes de la administración de los tratamientos.

Determinación del Efecto Hipoglucemiante

Tabla 2: Primers utilizados para qPCR

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
Beta-actina (11)	5'CTGCCCAGGC TTTTGTCAA 3'	5'CTCCAGTGCCAA GTCTGAA 3'
GLP-1 (proglucagon) (7)	5'ACCGCCCTGAG ATTACTTTTCTG 3'	5'AGTTCTCTTTCCA GGTTCACCAC 3'

Tabla 3: Condiciones para qPCR para 40 ciclos. (7)

Paso	Temperatura	Tiempo
Precalentamiento	96°C	1 minuto y 30 segundos
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Anilamiento	60°C	30 segundos
Extensión	72°C	20 segundos

Resultados y discusión

La diabetes Mellitus es un grupo de trastornos con complejas anomalías metabólicas caracterizado por una persistente hiperglicemia, deficiente secreción de insulina por el páncreas o una pobre respuesta del organismo hacia la insulina referido como resistencia a la insulina. La Diabetes Mellitus tipo I y II son los tipos más conocidos, sin embargo estos se pueden clasificar de acuerdo a otros parámetros, siendo Diabetes Gestacional, Diabetes MODY, Diabetes Mitocondrial, Diabetes Mellitus Tipo LADA y otros tipos específicos de Diabetes Mellitus. La diabetes es causada por una combinación de factores genéticos y ambientales, siendo la Diabetes tipo II la forma más común de esta enfermedad. En la actualidad el tratamiento y los esfuerzos para

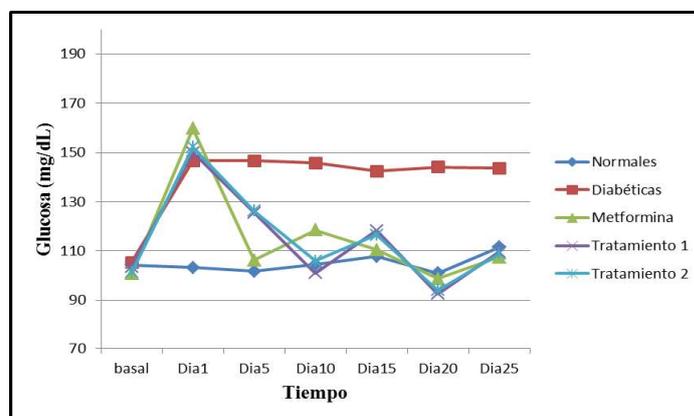


Figura 1. Cinética de la variación de la glicemia en cada grupo experimental, durante 25 días. (A: Grupo normal, B: Grupo Diabéticas, C: Grupo Metformina, D: Grupo Tratamiento 20mg/ml, E: Grupo Tratamiento 40mg/ml)

En la figura 1, observamos, la cinética de la glicemia de cada uno de los grupos experimentales hasta el día 25. Todos inician con similaridad, al ser inducida la diabetes, excepto el grupo de ratas normales. A partir del día 5, los tratamientos 1, 2 y metformina empiezan su disminución, siendo el día 15 hasta el 25 en los que la glicemia de estos grupos experimentales llega a ser similar a la del grupo de ratas normales, comprobándose de esta forma la capacidad hipoglucemiante de los tratamientos 1, 2 y Metformina. A pesar de que el grupo E representa el doble de concentración que el grupo D, no muestran diferencias estadísticamente significativas, al igual que ocurre con el grupo C que es un antidiabético conocido. El grupo A (blanco) nos permite observar si otra variable en la manipulación de los animales, modifica los niveles de glucemia, observando que no presentaron variación, lo cual demuestra que el

aislamiento, el alimento y la manipulación (administración del placebo) no alteraron la concentración sérica de glucosa.

Estos resultados podrían ser explicado sobre la base de que algún o algunos principios presentes en el extracto de "Canchalagua" estarían favoreciendo de alguna manera la regeneración o restablecimiento de algunos islotes que habrían permanecido durante el daño inducido por la Estreptozotocina, esto esta corroborado por los estudios histopatológicos durante el tiempo de estudio. Sin embargo, este no parece ser el mecanismo a través del cual actúa la Metformina (grupo C) ya que si bien se demostró su efecto hipoglicemiante, sus efectos sobre la integridad morfológica de los islotes del páncreas son muy bajos.

De otro lado, cabe destacar que la acción diabetogénica de la Estreptozotocina en animales esta mediada por la reducción del NAD en células pancreáticas, así como la liberación de cantidades toxicas de oxido nítrico. El daño del DNA causado por la alquilación mediada por Estreptozotocina es reparado por un proceso de reparación que requiere la activación de la enzima poli (ADP-ribosa) sinteasa dependiente de NAD. Se postula que en las células beta esta enzima esta continuamente activada, así agotando a la célula de NAD. La perdida crítica de NAD conduce al cese de la función celular y eventual muerte celular (referido al modelo Okamoto para daño de células beta) ⁽¹⁰⁾.

Estudio Histopatológico del páncreas de ratas

En el estudio histopatológico de páncreas en ratas *Wistar Novergicus* sin inducción a Diabetes Mellitus tipo 2, se aprecia parénquima pancreático con presencia de islotes de Langerhans en número, tamaño y arquitectura normal.

En el estudio histopatológico de páncreas en ratas *Wistar Novergicus* a los 2 días de la inducción a Diabetes Mellitus tipo 2, se aprecia parénquima pancreático con signos de pancreatitis aguda, y escasos islotes de Langerhans hipotróficos, con arquitectura distorsionada, bordes mal definidos, infiltrados por células de inflamación crónica

En el estudio histopatológico de páncreas en ratas *Wistar Novergicus* a los 25 días de la inducción a Diabetes Mellitus tipo 2, se aprecia parénquima pancreático con signos de pancreatitis aguda necrohemorrágica, y un solo islote de Langerhans hipotrófico, de bordes mal definidos, arquitectura distorsionada, infiltrados por células de inflamación crónica.

En el estudio histopatológico de páncreas en ratas *Wistar Novergicus* inducidas a Diabetes Mellitus tipo 2, tratadas con Metformina (320mg/kg) durante 25

días, se aprecia parénquima pancreático con presencia de escasos islotes de Langerhans hipotróficos.

En el estudio histopatológico de páncreas en ratas *Wistar Novergicus* inducidas a Diabetes Mellitus tipo 2, tratadas con extracto metanólico de Canchalagua (20mg/kg) durante 25 días, se aprecia parénquima pancreático con presencia de escasos islotes de Langerhans hipotróficos.

En el estudio histopatológico de páncreas en ratas *Wistar Novergicus* inducidas a Diabetes Mellitus tipo 2, tratadas con extracto metanólico de Canchalagua (40mg/kg) durante 25 días, se aprecia parénquima pancreático con presencia de islotes de Langerhans en numero, tamaño y arquitectura normales

Los resultados de este estudio corroboraron los descritos por Amaya-Chávez y cols. 2006⁽³⁹⁾, comprobando que la combinación de Nicotinamida y Estreptozotocina, 230 y 65 mg/kg respectivamente, originó en las ratas *Wistar novergicus* macho de 4 meses de edad un modelo experimental homólogo de diabetes tipo 2 caracterizada por hiperglicemia moderada y ligero daño a las células pancreáticas.

Evaluación de la expresión del gen GLP-1

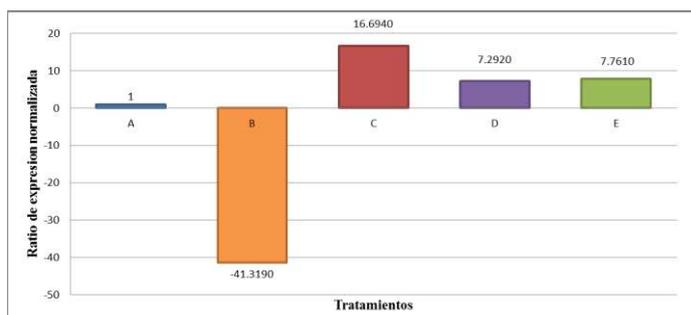


Figura 2. Representación grafica del nivel de expresión de los grupos experimentales en GLP-1. (A: Grupo normal, B: Grupo Diabéticas, C: Grupo Metformina, D: Grupo Tratamiento 20mg/ml, E: Grupo Tratamiento 40mg/ml)

Se observa el radio de expresión normalizada de los grupos experimentales para el gen GLP-1; es decir, el numero de veces que se expresa el gen GLP-1 comparadas con el grupo A (grupo normales), evaluado por qPCR en el colon distal de rata para cada grupo experimental. Observamos, que el grupo A, asignado como control tiene una expresión normalizada de 1. El grupo B, tuvo una expresión normalizada correspondiente a 0.024, que corresponde a una inhibición en la expresión de 41.319 veces comparada con el grupo A. El grupo C, mostró una sobreexpresión de 16.694 con respecto al grupo A, mientras que el grupo D y E tuvieron sobreexpresiones de 7.292 y 7.761 respectivamente comparadas con el grupo A.

En relación al efecto del extracto de *S. pinnata* sobre los niveles de expresión del gen GLP-1, se aprecia que existe una sobreexpresión comparada con el grupo A, sin embargo menor a la observada al administrar la Metformina (grupo C), adjuntando a esto, el estudio hipoglucemiante e histopatológico de los páncreas, se evidencia que el extracto de *S. pinnata* también estaría participando sinérgicamente con otros mecanismos.

En este sentido resulta importante señalar que estudios en la expresión de GLP-1 reportados por Hui H, Wright C y Perfetti R (2001)⁽¹¹⁾; Dan M, Chantler J (2011)⁽¹²⁾ demuestran que la sobreexpresión de GLP-1 reduce la hiperglicemia en ratas inducidas a diabetes mediante Estreptozotocina e induce la diferenciación de células secretoras de insulina. Asimismo, Mannucci E, Ognibene A y cols (2001)⁽¹³⁾ demostraron que la Metformina incrementa significativamente los niveles de GLP-1.

Además, estudios reportados por Xu G, Kaneto H y cols (2007)⁽¹⁴⁾ encontraron que la estimulación de la secreción de insulina por el GLP-1 y GIP son disminuidas en estados de diabetes tipo 2, debido a un defecto en los niveles del receptor inducidos por los estados diabéticos particularmente hiperglicemia.

Conclusiones

Se logro exitosamente la inducción de la Diabetes mellitus tipo 2 con la administración de Estreptozotocina - Nicotinamida, a dosis 65mg/kg y 330mg/kg respectivamente.

Los estudios histopatológicos de páncreas de los animales de experimentación en los grupos D y E (ratas diabéticas tratadas con el extracto metanólico 20mg/kg y 40mg/kg, respectivamente), muestran un posible efecto regenerador sobre los islotes pancreáticas.

La administración del extracto de Canchalagua en ratas con diabetes inducida tiene efecto hipoglucemiante estadísticamente significativo ($P < 0.05$), así como el grupo Metformina (Grupo C).

Los niveles expresión del gen GLP-1, evaluado por qPCR en los grupos C, D y E, tuvieron una sobreexpresión de 16.694, 7.292 y 7.761, respectivamente, comparadas con el grupo A; mientras que los animales de experimentación del grupo B, mostraron una inhibición de la expresión equivalente a 41.319 comparadas con el grupo A.

Agradecimientos

El trabajo fue diseñado y desarrollado experimentalmente gracias al apoyo y asesoría de:

Corina Vera Gonzales, Carlos Arenas Chávez, Fredy Zegarra Aragón, Azael Paz Aliaga y Jaime A. Yañez

Referencias

- [1] Flores R. Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas. Ediciones Cultural S.A. Madrid-España. 1997.
- [2] Stuart A. Ross, Jean-Marie Ekoe. Incretin agents in type 2 Diabetes. Clinical Review Vol. 56: July 2010.
- [3] Amaya-Chavez A, Dolores-Ledezma E, Alvarez-Sanchez P, Ferreira-Rubio G, Gomez-Olivan L, Galar-Martinez M. Evaluación de un modelo de Diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglucemiante de la Glibenclamida. Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas, Julio-Setiembre, año/vol. 38, numero 003. pp 5-11.
- [4] Villalta Pineda B, Yupanqui Calderón E. J. Efecto hipoglucemiante de la *Punica granatum L.* (Granada) en animales de experimentación, Arequipa - 2000. Tesis para optar el título profesional en Farmacia y Bioquímica. U.C.S.M. 2001.
- [5] Pénicaud L, Hitier Y, Ferré P, Girard J. Hypoglycaemic effect of metformin in genetically obese (fa/fa) rats results from an increased utilization of blood glucose by intestine. Laboratoire de Physiologie du Développement, Université Paris VII, L.A. 307 C.N.R.S., France
- [6] Thi-Mai Anh Dao, Wagent A, Klopp P, Serino M, Vachoux C, Pechere L, Drucker D, Champion S, Barthélemy S, Barra Y, Burcelin, Séré. Resveratrol increases Glucose induced GLP-1 secretin in mice: A mechanism which contributes to the glycemic control. PLoS ONE June 2011, Vol 6, Issue 6
- [7] Reimer R, Russell J. Glucose Tolerance, Lipids, and GLP-1 Secretion in JCR:LA-cp Rats Fed a High Protein Fiber Diet. *Obesity* (2008) 16, 40–46.
- [8] Tusie-Luna M. El componente genético de la Diabetes tipo 2. Unidad de Biología Molecular y Medicina genómica. Mensaje Bioquímico, Vol. XXXII, 2008. Mexico.
- [9] Grove J. K, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. Journal of Ethnopharmacology 81(2002), 81-100.
- [10] Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. Experimental Biology and Medicine. 2012, 237;481-490.
- [11] Hui H, Wright C, Perfetti R. Glucagon-Like Peptide 1 Induces Differentiation of Islet

- Duodenal Homeobox-1–Positive Pancreatic Ductal Cells Into Insulin-Secreting Cells. *Diabetes*, vol. 50, april 2001.
- [12] Dan M, Chantler J.K. A novel pancreatropic Coxsackievirus vector expressing Glucagon-like peptide 1 reduce hyperglycemia in Streptozotocin-Treated mice. *Journal of Virology* 2011.
- [13] Mannucci E, Ognibene A Y cols. Effect of Metformin on Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2001.
- [14] Xu G, Kaneto H, Laybutt D.R, Duvivier-Kali V.F. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: Possible contribution to impaired incretin effects in Diabetes. *American Diabetes Association*. 2007.

E-mail:alezg_15@hotmail.com, djdd66@hotmail.com