

Efecto inhibitorio de *Bauhinia variegata* L. sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina

CARMEN DE LOS RÍOS*, HERMINIA GIL, DORIS HIDALGO BÁEZ.
Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Universidad de Los Andes.
Mérida, Venezuela.

* Autor para la correspondencia. Tel: 58 274 2713479; Fax: 58 274 2401286
e-mail: merchidelosrios@hotmail.com; herminia_gil@latinmail.com;
hidalgo_baez@hotmail.com

RESUMEN

Una decocción de las hojas de *Bauhinia variegata* L. es ampliamente utilizada en la medicina tradicional Venezolana como antidiabética. La decocción de las hojas de esta especie demostró un significativo efecto inhibitorio *in vitro* sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina. Los resultados sugieren un potencial antidiabético de *Bauhinia variegata* L. para la prevención de las complicaciones diabéticas.

ABSTRACT

A decoction of *Bauhinia variegata* L. leaves. is widely used in Venezuelan traditional medicine as antidiabetic. The leaves decoction from this species demonstrated a significant inhibitory effect of *in vitro* hemoglobin nonenzymatic glycation. The results suggest the antidiabetic potential of *Bauhinia variegata* L. for the prevention of diabetic complications.

PALABRAS CLAVE

Bauhinia variegata, Casco de Vaca, diabetes, glucación, Hb glicosilada, actividad hipoglucemiante.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico, CDCHT, (C-766-95-03-C) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por el soporte financiero a esta investigación.

INTRODUCCIÓN

La diabetes crónica está asociada con varias complicaciones, incluyendo neuropatías, cataratas, retinopatías, nefropatías y riesgo de arterioesclerosis

(Molinoff, 1987). Esto ocurre debido a que los pasos envueltos en el metabolismo de los niveles de glucosa no ocurren a velocidades fisiológicas. Un mecanismo propuesto para explicar el daño de los tejidos producido por el exceso de glucosa en sangre en la diabetes mellitus es la glucación no enzimática de proteínas o reacción de Maillard. Maillard fue el primero en estudiar la aparición de pigmentos dorados durante el cocimiento o almacenamiento de alimentos, debido a la reacción entre los grupos carbonilos de azúcares y los grupos amino libres de las proteínas de los alimentos, los cuales se vuelven insolubles y forman productos marrones estables y fluorescentes unidos a ellos (Dvornik, 1987). La glucación no enzimática comienza con la reacción entre los grupos amino libres de las proteínas y los grupos carbonilo de la cadena abierta de azúcares reductores, para formar una aldimina o base de Schiff seguido de un rearrreglo de Amadori que conduce a la formación de una cetamina estable o producto de Amadori, el cual es estabilizado por la formación de un hemiacetal cíclico: proteína glucada (Bunn et al., 1975; Higgins y Bunn, 1981; Gómez et al., 1996). El producto de Amadori sufre una serie de reacciones y forma los productos de glucación avanzada, AGEs (Brownlee et al., 1986). La acumulación de los AGEs puede contribuir a las complicaciones de la diabetes, al envejecimiento normal y al mal de Alzheimer (Bellmunt et al., 1995; Booth et al., 1997). Se cree que *in vivo* y bajo condiciones fisiológicas esta reacción ocurre lenta e irreversiblemente formando productos estables que son acumulados en los tejidos, especialmente en las proteínas que tienen una lenta velocidad de regeneración. La velocidad y extensión de la glucación *in vivo* depende de la vida media biológica de las proteínas, de las concentraciones de glucosa en plasma y de los factores estéricos que afectan la accesibilidad de los grupos amino (Shapiro et al., 1980; Cohen, 1986). Esta reacción tiene un efecto sobre la estructura de las

proteínas, cambiando sus propiedades funcionales y biológicas (Van Boekel et al., 1992). Así, se ha sugerido que probablemente la glucación desempeña una función importante en el desarrollo de la fisiopatología de las complicaciones diabéticas y en el proceso de envejecimiento (Van Boekel et al., 1992; Sell y Monnier, 1990). La glucación no enzimática de la hemoglobina tiene gran importancia en la diabetes puesto que los estudios muestran que los niveles de hemoglobina glucada (HbA_{1C}) aumenta en los pacientes con hiperglucemia. La hemoglobina glucada refleja la concentración promedio de glucosa durante el tiempo de vida de los eritrocitos (Bunn et al., 1976). HbA_{1C} es formada por glucación del grupo amino del residuo N valina terminal en la cadena b de la hemoglobina, que es el más reactivo tanto *in vivo* como *in vitro*. Las medidas de hemoglobina glucada son rutinariamente utilizadas como el parámetro más simple y confiable para evaluar el control glucémico en pacientes diabéticos.

Hay gran interés en el estudio de compuestos que puedan inhibir la glucación. Los estudios muestran que la aminoguanidina inhibe la glucación por una interacción entre sus grupos reactivos y los grupos carbonilos del producto de Amadori, previniendo así, la formación de los AGEs (Brownlee et al., 1986). Otros compuestos que muestran efecto inhibitorio sobre la glucación son: aspirina (Hun-Opfer y Mata-Sagreda, 1986; Rendell et al., 1986; Mata-Sagreda et al., 1989; Malik y Meek, 1994), diclofenac (Van Boekel et al., 1992), guanidina (Tilton et al., 1993), y derivados de las vitaminas B1 y B6 (Booth et al., 1997).

La especie *Bauhinia variegata* L. (Caesalpinaceae) fue seleccionada de la información etnobotánica, para realizar una evaluación *in vitro* de su actividad inhibitoria sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina a través de medidas de hemoglobina glucada. Esta especie, ampliamente distribuida en Venezuela, y comúnmente llamada "Casco de Vaca", es la más frecuentemente utilizada en la medicina tradicional venezolana como un remedio para el tratamiento de la diabetes (López Palacios, 1987; Gil Otaiza, 1997). La información etnomédica también reporta su uso en el tratamiento de la hipertensión, disentería y como un agente diurético y antihelmíntico (Bhattacharai, 1993; Manandhar; 1993; Manandhar; 1995).

Los estudios químicos realizados a esta planta reportan el aislamiento e identificación de lupeol, beta-sitosterol y 5,7-dimetoxiflavanona-4'-O-a-L-rhamnopiranosil-b-D-glucopiranosido (Gupta et al., 1980).

Recientemente se ha enfocado mucho interés en el uso de ciertos compuestos para prevenir la glucación y/o la formación de los productos de entrecruzamiento *in vivo* o *in vitro*. La formación del producto de

Amadori representa un punto importante para inhibir este proceso por bloquear los carbonilos reactivos en el producto de Amadori.

Nosotros hemos evaluado *in vitro* el efecto inhibitorio de la decocción de las hojas de *Bauhinia variegata* L. sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina. El propósito de este trabajo es la búsqueda de un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto inhibitorio. El descubrimiento de inhibidores de la glucación podría aportar importantes conocimientos para el tratamiento de las complicaciones patológicas en pacientes diabéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de la Planta

La especie *Bauhinia variegata* L. fue colectada en el Jardín Botánico, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Estado Mérida, Venezuela (D. Hidalgo Báez, C. de los Ríos, y J. Angulo, Abril 1996). El espécimen fue taxonómicamente clasificado por el Perito Forestal Giuseppe Adamo, Centro Jardín Botánico, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, y una muestra, voucher (# 1), es conservada en el Herbario MERC de esta Facultad.

Preparación de la Decocción

Aproximadamente 100 g de las hojas secadas a temperatura ambiente, protegidas de la luz directa y molidas fueron sometidas a una decocción con agua destilada a ebullición durante 25 minutos. La decocción fue filtrada y liofilizada. El sólido (8,2745 g) fue almacenado a -4°C hasta su evaluación. Las muestras del extracto de la planta fueron preparadas a concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL en buffer Tris 10 mM, pH 7,3 para realizar una evaluación *in vitro* de su efecto inhibitorio sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina. Todas las soluciones fueron esterilizadas por ultra filtración a través de filtros Nalgene 0,2 μ y las muestras de reacción fueron preparadas a 0 °C y bajo luz UV en tubos plásticos estériles Nalgene.

Ensayos con la Hemoglobina

Una solución estéril de 2 mL de hemoglobina humana 0,465 mM en NaCl 0,15 M fue mezclada con 6mL de solución estéril de glucosa 50 mM en buffer Tris 10 mM, pH 7,3 a 0 °C en ausencia y en presencia de 2 mL del extracto de la planta potencialmente inhibidora (5 mg/mL, 10 mg/mL y 20 mg/mL disueltos en buffer Tris 10 mM a pH 7,3). Las mezclas de reacción fueron colocadas en tubos estériles e incubadas a 37 °C durante 21 días. Los tubos fueron retirados a intervalos de tiempo específicos y la hemoglobina

glucada (HbA_{1c}) fue determinada por cromatografía de intercambio iónico (Sigma Chemical Co. MO USA, Kit N° 441).

Las constantes de velocidad para las reacciones de pseudo primer orden fueron determinadas con los datos de la cantidad de hemoglobina glucada como una función del tiempo, usando un procedimiento no lineal de mínimos cuadrados para la ecuación de la reacción de primer orden.

$$A_t = A_f + (A_o - A_f) e^{-kt}$$

Donde:

A_t = %HbA_{1c} a intervalos de tiempo específicos.

A_o = %HbA_{1c} a tiempo cero.

A_f = 100 %HbA_{1c}.

t = tiempo.

k = constante de velocidad de primer orden.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra un estudio *in vitro* comparativo sobre la glucación de la hemoglobina en ausencia o en presencia de 4 mg/mL del extracto de la planta. Las concentraciones de glucosa y hemoglobina fueron constantes en ambos experimentos 30 mM y 9,3 x 10⁻² mM, respectivamente, pH 7,3 a 37 °C durante 21 días. La tabla 1 lista el porcentaje de formación de HbA_{1c} como una función del tiempo. La formación de hemoglobina glucada aumenta con el tiempo en ambos casos, pero la reacción es más lenta en presencia del extracto vegetal bajo condiciones idénticas. Se encontró que la presencia extracto de la planta causa una disminución en los niveles de HbA_{1c} comparado con el % HbA_{1c} sin muestra vegetal. (Tabla 1). El resultado es indicativo del efecto inhibitorio de *Bauhinia variegata* L. sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina.

Tabla 1. Velocidad de formación de hemoglobina glucada como una función del tiempo para la glucación no enzimática de la hemoglobina humana 9,3 x 10⁻² mM con glucosa 30 mM en buffer Tris 10 mM a 37 °C, pH 7,3 en ausencia o en presencia del extracto de la planta.

Tiempo (h)	% HbA _{1c} sin extracto de la planta	% HbA _{1c} en presencia de 4 mg/mL del extracto de la planta	% HbA _{1c} (sin extracto de la planta) - % HbA _{1c} (con extracto de la planta)
70	24,66	17,21	7,45
118	43,14	21,02	22,12
166	47,72	27,77	19,95
292	53,13	42,43	10,70
454	59,56	42,95	16,61
506	61,43	49,41	12,62
598	74,37	59,93	14,44

La tabla 2 lista el porcentaje de formación de HbA_{1c} como una función de la concentración del extracto de la planta. Las concentraciones de hemoglobina y glucosa fueron mantenidas constantes a 9,3 x 10⁻² mM y 30 mM, respectivamente. La concentración del extracto vegetal fue variada de 1 mg/mL a 4 mg/mL. La formación de HbA_{1c} aumentó con el tiempo en todos los casos, pero el porcentaje de HbA_{1c} disminuyó como una función de la concentración del extracto de la planta a cualquier tiempo.

Tabla 2. Velocidad de formación de hemoglobina glucada como una función del tiempo para la glucación no enzimática de la hemoglobina humana 9,3 x 10⁻² mM con glucosa 30 mM en buffer Tris 10 mM a 37 °C, pH 7,3 a varias concentraciones del extracto de la planta.

Tiempo (h)	% HbA _{1c} Concentración del extracto de la planta		
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
48	20,48	18,67	15,47
65	32,15	25,81	21,83
161	47,42	35,48	27,13
209	62,71	48,95	42,53
402	71,84	58,72	48,35
498	70,04	59,63	51,22

La tabla 3 lista las constantes de velocidad de primer orden para la glucación no enzimática de la hemoglobina como una función de la concentración del extracto de la planta bajo condiciones idénticas. La disminución de las constantes de velocidad con el aumento de la concentración del extracto vegetal es indicativa de la inhibición de la planta para la glucación no enzimática de la hemoglobina.

Tabla 3. Constantes para la glucación no enzimática de la hemoglobina humana como una función de la concentración del extracto de la planta. Hemoglobina humana 9,3 x 10⁻² mM, buffer Tris 10 mM, pH 7,3, NaCl 0,15 M, glucosa 30 mM a 37 °C.

Concentración del extracto de la planta	k x 10 ⁷ s ⁻¹
1 mg/mL	7,52 ± 0,15
2 mg/mL	4,79 ± 0,70
4 mg/mL	3,55 ± 0,61

En conclusión, estos datos sugieren que *Bauhinia variegata* L. puede tener un efecto inhibitorio sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina y, además, podría ser de valor terapéutico en el tratamiento de la diabetes. El mecanismo de acción por el cual *Bauhinia variegata* L. podría prevenir la glucación aún se desconoce. Estos posibles mecanismos podrían ser la habilidad de algunos compuestos presentes en esta planta para atacar los grupos carbonilo del producto de Amadori, inhibiendo la reacción entre este producto y los grupos de proteínas de la sangre, y previniendo la formación

de los AGEs. *Bauhinia variegata* L. también podría actuar bloqueando los sitios de ataque de la glucosa y compitiendo por los grupos amino libres de la hemoglobina, reduciendo la formación del producto de Amadori y, además, disminuyendo los niveles de producción de los AGEs.

Son necesarios estudios posteriores para clarificar el mecanismo preciso para esta inhibición. Sería de gran interés investigar la efectividad *in vivo* de esta especie, lo cual soportaría el uso etnomédico de esta planta y su potencial valor terapéutico para las complicaciones diabéticas.

El método ensayado (Sigma Kit N° 441) es ampliamente utilizado para evaluar pacientes diabéticos a través de una determinación cuantitativa de hemoglobina glucada. Esta prueba, técnicamente sencilla, produce una cuantificación precisa y confiable de las concentraciones de HbA_{1c}; y podría ser usada como un ensayo preliminar para evaluar la posible actividad antidiabética de plantas usadas en la medicina tradicional.

Este es el primer estudio realizado *in vitro* acerca del posible efecto que *Bauhinia variegata* L. tiene sobre la diabetes a través de una evaluación de su efecto inhibitorio de la glucación no enzimática de la hemoglobina.

Según la literatura consultada este método *in vitro* para una evaluación biológica no ha sido reportado aún.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bellmunt, M.J., Portero, M., Pamplona, R., Cosso, L., Odetti, P. and Prat, J. 1995. **Evidence for the Maillard reaction in rat lung collagen and its relationship with solubility and age.** Biochim. et Biophys. Acta. 1272: 53-60.

Bhattarai, N.K. 1993. **Herbal remedies for diarrhoea and dysentery in Central Nepal.** Fitoterapia. 64 (3): 243-250.

Booth, A.A., Khalifah, R.G., Todd, P. Hudson, B.G. 1997. **In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs).** J. Biol. Chem. 272 (9): 5430-5437.

Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A. Ulrich, P., Cerami, A. 1986. **Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking.** Science. 232: 1629-1632.

Bunn, H.F., Haney, D.N., Gabbay, K.H., Gallop, P.M. 1975. **Further identification of the nature and linkage of carbohydrate in hemoglobin A_{1c}.** Biochem. and Biophys. Res. Comm. 67: 103-109.

Bunn, H.F., Haney, D.N., Kamin, S., Gabbay, K.H.,

Gallop, P.M. 1976. **The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}: Slow glycosylation of hemoglobin *in vivo*.** J. Clin. Invest. 57: 1652-1659.

Cohen, M.P. 1986. **Diabetes and Protein Glycosylation Measurement and Biological Relevance.** Springer-Verlag, New York. USA.

Dvornik, D. 1987. **Hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications.** In: Daniel Porte (Ed.), **Aldose Reductase Inhibition. An Approach to the prevention of diabetic complications.** Mc Graw-Hill. N.Y. USA. P. 92-93.

Gil Otaiza, R. 1997. **Plantas usuales en la medicina popular venezolana.** Editorial Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. P. 81-82.

Gómez de Anderez, D., Gil, H., Helliwell, M., Mata-Sagreda, J. 1996. **N-(p-Tolyl)-Amine-1-D-fructose from a small crystal.** Acta Crystal. C52: 252-254.

Gupta, A.K., Vidyapati, T.J., Chauhan, J.S. 1980. **Chemical examination of the stem of *Bauhinia variegata*.** Planta Medica. 38:174-176.

Higgins, P.J., Bunn, H.F. 1981. **Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin.** J. Biol.Chem. 256: 5204-5208.

Hun-Opfer, C., Mata-Sagreda, J.F., 1986. **Non-enzymatic acetylation of proteins by aspirin as protection against the secondary complications of diabetes mellitus.** Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 36: 313-316.

López Palacios, S. 1987. **Usos Médicos de Plantas Comunes.** Talleres Gráficos Universitarios. Mérida. Venezuela. P. 46.

Malik, N.S., Meek, K.M. (1994) **The inhibition of sugar-induced structural alterations in collagen by aspirin and other compounds.** Biochem. and Biophys. Res. Comm. 199 (2): 683-686.

Manandhar, N.P. 1993. **Herbal remedies of Surkhet District, Nepal.** Fitoterapia. 64 (3): 266-272.

Manandhar, N.P. 1995. **Medicinal folklore about the plants used as anthelmintic agents in Nepal.** Fitoterapia. 66 (2): 149-155.

Mata-Sagreda, J.F., Fernández-Azofeifa, E., Madrigal, X., Morales, A.C. (1989). **Clinical evaluation of acetylsalicylic acid to improve glycemia in type II diabetic patients.** Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 39: 9-13.

Molinoff, M.S. 1987. **Complications of chronic diabetes in man and their relation to hyperglycemia.** In: Daniel Porte (Ed.), **Aldose Reductase Inhibition. An Approach to the prevention of diabetic complications.** Mc Graw-Hill. N.Y. USA. P.7.

Rendell, M., Nierenberg, J., Brannan, C., Valentine, J.L., Stephen, P.M., Dodds, S., Mercer, P., Smith, P. and Walder, J. 1986. **Inhibition of glycation of albumin and**

hemoglobin by acetylation *in vitro* and *in vivo*. J. Lab. Clin. Med. 108 (4): 286-293.

Sell, D.R. y Monnier, V.M. 1990. **End stage renal disease and diabetes catalize the formation of a pentose-derived cross-link from aging human collagen.** J. Clin. Invest. 85: 380-384.

Shapiro, R., McManus, M.J., Zalut, C., Bunn, H.F. 1980. **Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A.** J. Biol. Chem. 255: 3120-3127.

Tilton, R.G., Chang, K., Hasan, K.S., Smith, S.R., Petrash, J.M., Misko, T.P., Moore, W. M., Currie, M.G., Corbett, J.A., McDaniel, M.L., Williamson, J.R. 1993. **Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines: inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation.** Diabetes. 42: 221-232.

Van Boekel, M.A.M., Van der Bergh, P.J.P.C., Hoenders, H.J. 1992. **Glycation of human serum albumin: Inhibition by diclofenac.** Biochim. et Biophys. Acta. 1120: 201-204.