

EFFECTO HIPOGLICEMIANTE DE *Costus speciosus* (Zingiberaceae), EN RATAS

HIPOGLYCEMIC EFFECT OF COSTUS SPECIUS (ZINGIBERACEAE), ON RATS

Angel L. Guzmán* y Ricardo O. Guerrero**

RESUMEN

Durante muchos siglos la gente ha usado plantas con propiedades medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades. Una de estas enfermedades es diabetes mellitus. Una de las plantas usadas ampliamente por la población en Puerto Rico es *Costus speciosus* conocida vulgarmente como insulina. El objetivo principal de este estudio fue analizar las propiedades hipoglicemiantes que se le atribuyen al extracto de esta planta. Con estos fines se llevaron a cabo experimentos con ratas Sprague Dawley, a las cuales se les había inducido diabetes por medio de la inyección de estreptozotocina i.p. A un grupo de diez de estas ratas en ayunas (Grupo A) se le dio a tomar el extracto por 24 horas, mientras que a otro grupo testigo de diez ratas (grupo B) se le administró agua. El grupo A tuvo niveles de glucosa sanguínea significativamente inferiores a las ratas del grupo testigo. En otro experimento se incubaron células endoteliales con o sin el extracto de la planta en presencia de 2-desoxi-³H-glucosa (DG). Hubo una mayor captación de DG en las células que contenían el extracto de la planta. Esto indica que el extracto contiene algún o algunos compuestos que facilitan la entrada de glucosa a las células cuya acción es similar a la de insulina. En los ensayos de toxicidad general usando *Artemia salina* L., el valor CL₅₀ μ 18.45: g/mL demuestra la presencia de uno o varios agentes farmacológicamente activos en el extracto. En conclusión, el extracto de *Costus speciosus* muestra un efecto hipoglicemiante en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Además, el extracto de esta planta estimula la captación de DG en las células endoteliales.

Palabras clave: *Costus speciosus*, Puerto Rico, diabetes, streptozotocin, 2-deoxy-³H-glucose.

* Escuela de Medicina San Juan Bautista. P. O. Box 4968. Caguas, PRO07264968 Fax (787) 746-3093

** Escuela de Farmacia, Recinto de Ciencias Médicas, Universidad de Puerto Rico. P.O. Box 5067. Sn Juan, Fax (787) 767-2796
Dirigir correspondencia a la dirección electrónica: rguerre@rcm.upr.edu

ABSTRACT

People have used plants with medicinal properties for the treatment of diverse disease states for several centuries. One of these maladies is diabetes mellitus. One of the plants amply utilized by the Puerto Rican population is *Costus speciosus* also known as “insulina”. The main objective of this study was to screen the plant extract for its putative hypoglycemic properties. One experiment was carried out with streptozotocin diabetes induced Sprague-Dawley rats. To one group of ten fasted rats (Group A), the extract of the plant was given orally for 24 hours, while the control group of ten rats (Group B) was administered water. Group A showed significantly lower blood glucose levels than Group B. In another experiment, endothelial cells were incubated with or without the plant extract in presence of 2-deoxy-³H-glucose (DG). The cells with the plant extract had a higher uptake of DG. This result indicates that the extract contains one or several compounds that facilitate the entrance of DG into the cells in a similar way as insulin. In the general toxicity bioassay using *Artemia salina* L., the CL50 18.45 µg/mL points to the presence of one or several pharmacologically active agents in the extract. In conclusion, the extract of *Costus speciosus* demonstrates the presence of hypoglycemic effect in streptozotocin diabetes induced rats. In addition, the plant extract increases the uptake of DG in endothelial cells.

Key words: *Costus speciosus*, Puerto Rico, diabetes, streptozotocin, 2-deoxy-³H-glucose.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos siglos la gente ha usado plantas con propiedades medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades, inclusive diabetes mellitus. La literatura nos indica que numerosas plantas han sido consideradas como efectivas y no tóxicas. Ellas poseen un gran potencial pero han sido exploradas solo parcialmente por métodos modernos. En algunos casos, ciertos principios activos han sido aislados aunque éstos necesitan superar pruebas de toxicidad aguda y crónica en animales, antes de pasar a estudios clínicos en humanos. Por otro lado, el uso continuo de la flora por la gente de diversos países para el tratamiento del Tipo 2 de diabetes mellitus es indicativo del potencial de las plantas. En Puerto Rico, en un estudio realizado en 1984 con pacientes ambulatorios, el 57% había indicado que utilizaba plantas medicinales, además de medicamentos recetados para combatir las enfermedades¹.

Una de las plantas que está siendo utilizada ampliamente por un segmento de la población en Puerto Rico es *Costus speciosus* (Koenig) Smith, conocida vulgarmente como “insulina”.

La carencia de información sobre el posible efecto hipoglicémico de las partes de la planta utilizadas por la gente nos motivó a realizar un estudio de avalúo científico con extractos de las hojas y tallos de esta planta.

La búsqueda de información en la literatura produjo algunos resultados obtenidos en la investigación de esta planta. El rizoma de *Costus speciosus* contiene apreciables cantidades de glicósidos de espirostanol (saponinas esteroidales), todas las cuales producen diosgenina como la única sapogenina², mientras que las sapogeninas obtenidas de la mayoría de las plantas que producen saponinas muestran heterogeneidad estructural. Además, se ha descubierto actividad estrogénica con las saponinas presentes en los rizomas de esta especie³. Posteriormente,

estudiando los rizomas de esta planta, se aisló el éster metílico del ácido p-cumárico, identificándose una actividad antifúngica para este compuesto⁴. En 1996, investigadores japoneses purificaron y caracterizaron una beta glucosidasa del rizoma de *Costus speciosus* que convierte los glicósidos de furostanol a glicósidos de espirostanol⁵. El estudio más importante para el tema que nos interesa indica que tres plantas del Himalaya, una de las cuales es *Costus speciosus*, fueron evaluadas por los efectos hipoglicemiantes. El rizoma de esta planta mostró efectos hipoglicemiantes en ratas no diabéticas ($p < 0.05$) y en ratas a las cuales se les indujo la enfermedad ($p < 0.002$)⁶. La conclusión de esta investigación indica que existen posibilidades interesantes para que *Costus speciosus* sea una fuente de agentes hipoglicemiantes orales.

Los tres objetivos de nuestra investigación consistieron en: **1.** Examinar si las hojas y tallos de *Costus speciosus* que son utilizados habitualmente en la preparación de infusiones, poseen actividad hipoglicemiante; **2.** Valorar la captación de 2-desoxi-³H-glucosa en células endoteliales con o sin el extracto de esta planta y; **3.** Evaluar la toxicidad general del extracto usando el bioensayo de *Artemia salina* Leach.

MATERIALES Y METODOS

Efecto de *Costus speciosus* en los niveles de glucosa sanguínea de ratas a las cuales se les había inducido diabetes

La planta fue identificada por el Dr. George P. Proctor del Departamento de Recursos Naturales del Estado Libre Asociado de Puerto Rico. Una muestra testigo permanece en el herbario de este Departamento. La planta fue recolectada por A.L. Guzmán en Caguas, Puerto Rico en abril del 1999. Posteriormente se hicieron varios extractos acuosos añadiendo 30 gramos de hojas secas o tallos de *Costus speciosus* completamente pulverizados a 500 mililitros de agua hirviendo. La suspensión obtenida se dejó en el

agua caliente sin hervir por 30 minutos para extraer los constituyentes de la planta. El extracto se filtró y se mantuvo en nevera a 5° C para usarlo en los experimentos con ratas.

Inducción de diabetes

Se usaron dos grupos de 10 ratas (A y B) Sprague Dawley machos de 250-280 gramos. Los animales estuvieron en ayunas 24 horas y luego se les inyectó estreptozotocina disuelta en solución salina normal (0.9%) intraperitoneal en dosis de 65 mg/kg de peso para la inducción de diabetes⁷. Para comprobar la efectividad de este tratamiento en la inducción de diabetes se hizo un análisis de glucosa sanguínea veinticuatro horas después. Aquellos animales que tenían niveles de glucosa de 300 mg/dL o más se consideraban diabéticos. Estos animales (Grupos A y B) se usaron en los siguientes procedimientos: a todos se les dio suficiente alimento hasta el día del experimento. Los animales se pusieron en ayunas por 24 horas. Al grupo **A** se le dió a beber el extracto de *Costus speciosus*, *ad libitum* por 24 horas mientras que al grupo **B** se le administró agua y se determinaron los niveles de glucosa sanguínea en ayunas, por medio de un glucómetro a diferentes tiempos: 0, 18, 21 y 24 horas. El volumen del extracto consumido por cada rata del grupo **A** durante el tiempo que duró el experimento fue un promedio de 24 ml mientras que el grupo **B** tomó un promedio de 25 ml de agua.

Cultivo e incubación de células endoteliales capilares

Las células endoteliales se subcultivaron en un medio suplementado con suero de becerro al 10% que contenía lo siguiente: glutamina, penicilina, estreptomycin, 5% de bióxido de carbono con 95% de aire a una temperatura de 37° C. Se utilizó un microplato de 96 pozos, de los cuales se usaron 24. Se cultivaron 5×10^4 células por

pozo por un tiempo de 5-7 días. Al final de este período, las células se lavaron tres veces con "Standard Reaction Mixture" (SRM). El SRM consiste de 118 mM NaCl, 1.2 mM MgSO₄, 6.7 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 10 μM Mannitol, 25 mM Hepes NaOH; pH 7.4⁸. Posteriormente, a cada uno de nueve pozos se añadió 0.5 mL de SRM y 1 mCi/ml de 2-desoxi-³H-glucosa con el extracto de *Costus speciosus* y se incubó por 5 minutos a una temperatura de 37° C. Además, se hicieron experimentos equivalentes a los anteriores, pero sin el extracto. Estos sirvieron como testigo. En otros experimentos similares a los anteriores, se analizaron las siguientes variables: cambios en la concentración del extracto, el efecto del extracto del tallo de *Costus speciosus* y la influencia de insulina (1 mg/mL). Al final de la incubación, las células se lavaron 3 veces con el amortiguador "Phosphate Buffered Saline" (PBS) y se les agregó 0.5 mL de SRM. Luego, se congelaron y descongelaron rápidamente en tres ocasiones seguidas con el objeto de romper las membranas celulares y medir la radioactividad correspondiente a alícuotas del líquido obtenido del interior de las células y los fragmentos de éstas⁹. La radioactividad en cuentas por minuto (CPM) es equivalente a la cantidad de 2-desoxi-³H-glucosa que se unió a las células o que penetró al interior de estas y aparece expresada en las barras enumeradas de la Figura 1. Esta es la radioactividad captada por las células procedentes de DG. Además se grafican la radioactividad en CPM versus DG, insulina y diferentes concentraciones de los extractos.

Estudio Toxicológico

A una de las ratas se le dió a tomar extracto de la hoja de *Costus speciosus* por 24 horas, luego de lo cual se sacrificó. El hígado y los riñones fueron enviados al Departamento de Toxicología de la Universidad de Miami para un estudio patológico. No se encontró evidencia de toxicidad en estos órganos.

Bioensayo de toxicidad general usando *Artemia Salina L.*

El protocolo de Solís et al.¹⁰ que emplea diluciones en serie del extracto de la planta en un microplato de 96 depresiones, fue usado en nuestro experimento. De acuerdo a este procedimiento, se preparó una solución del extracto (1mg/ml) Utilizando como solvente agua de mar artificial. Para una mejor dilución del extracto, antes de añadir el agua de mar, se trató el extracto con 50 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). La preparación y obtención de los nauplios de *Artemia salina L.* se realizaron de acuerdo al procedimiento expuesto en el mismo protocolo. El método de análisis Probit descrito por Finney se utilizó para calcular los valores de CL₅₀. El valor CL₅₀ obtenido fue 18.453 mg/ml.

RESULTADOS

Los resultados aparecen expresados en las Figuras 1 y 2.

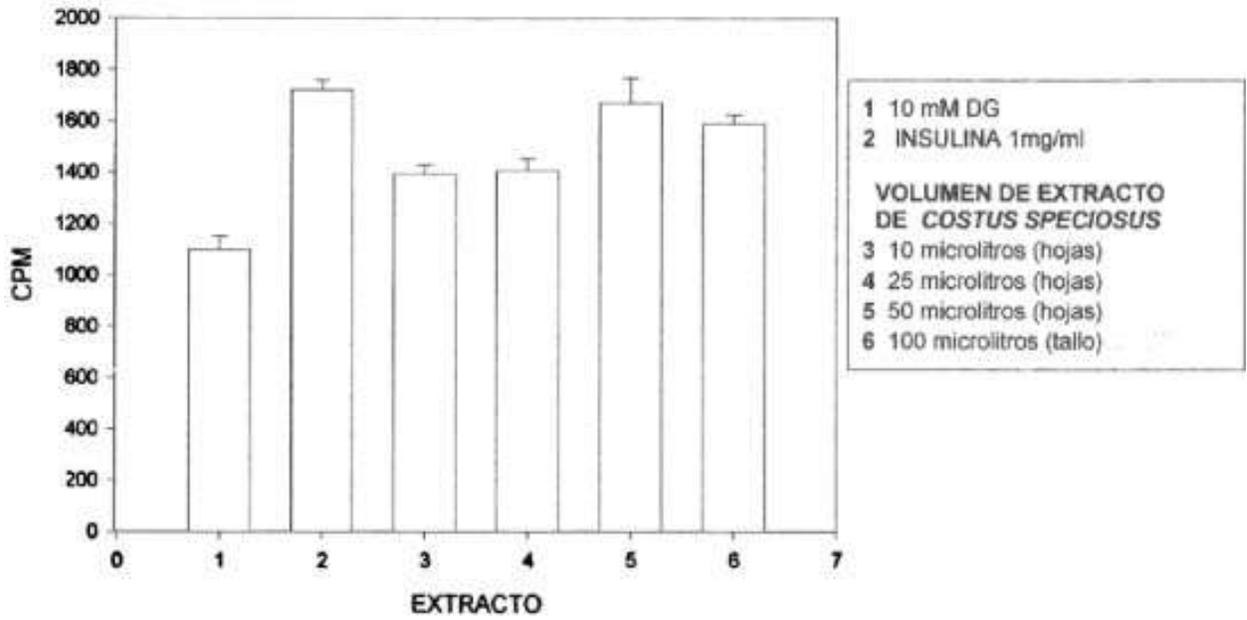


Figura 1. Efecto de *Costus Speciosus* en la captación de 2-DESOXI- H^3 D-GLUCOSA (DG) por las células endoteliales.

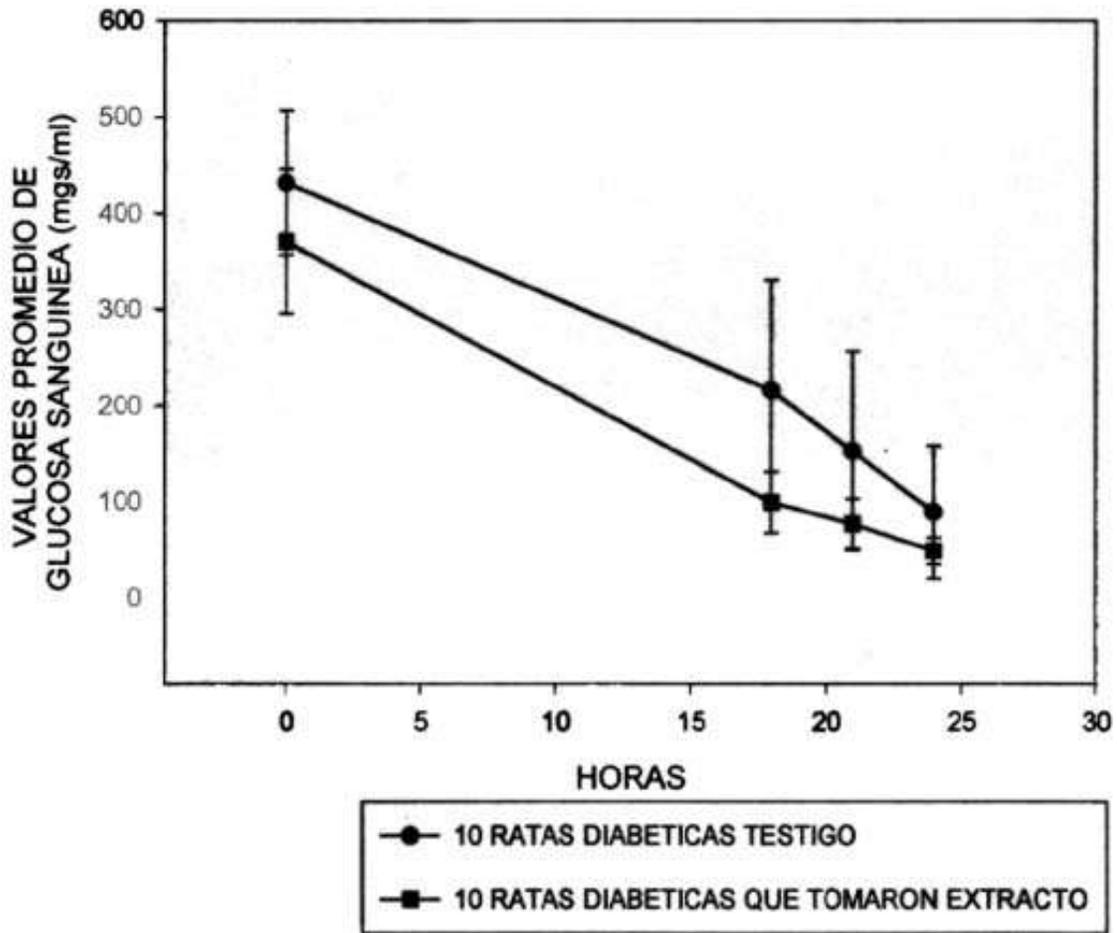


Figura 2. Efecto del extracto de *Costus Speciosus* en ratas Sprague Dawley.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Efecto de *Costus speciosus* en los niveles de glucosa sanguínea de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina.

En este experimento se usaron dos grupos de 10 ratas (**A** y **B**) con diabetes inducida como se indicó en Materiales y Métodos. Todos los animales se pusieron en ayunas por 24 horas al comienzo del experimento. Al grupo **A** se le dio a tomar el extracto de *Costus speciosus ad libitum* y al **B** se le dio agua. A todos se les hizo una determinación de glucosa sanguínea por colorimetría a los siguientes intervalos de tiempo: 0, 18, 21, y 24 horas. Vea Figura 2.

Se hizo una prueba estadística (t-Test) considerando $P < 0.05$ y se obtuvo un valor altamente significativo al tiempo de 18 horas ($P = 0.02$). Esto significa que el extracto produce una disminución en glucosa sanguínea en ratas que tienen diabetes inducida con estreptozotocina en el tiempo indicado de 18 horas.

Efecto de extractos de *Costus speciosus* en la captación de 2-desoxi-³H- glucosa por células endoteliales.

La Figura 1 indica que al comparar estadísticamente la columna 3 (10 :l del extracto de hojas) con la columna 1 (10 mM DG) se obtuvo un resultado significativo ($P < 0.05$). Esto muestra que el extracto de las hojas de *Costus speciosus* estimuló significativamente la captación de 2-desoxi-³H-glucosa (DG). Esto explica la acción del extracto en disminuir los niveles de glucosa sanguínea *in vivo* (Vea Figura 2). El efecto de un aumento en la dosis del extracto produce un aumento en la captación de 2-desoxi-³H- glucosa, según lo muestran las barras 3, 4 y 5 (10, 25 y 50 :l de extracto de hoja).

Al comparar los valores de las barras 5 con la 3 encontramos que hubo un cambio en la captación de DG, por efecto del extracto de las hojas de *Costus speciosus*, estadísticamente significativo ($P < 0.05$). Este efecto es similar al que produciría insulina. Sin embargo, la diferencia entre las barras 5 y 6, que mide el efecto de la captación de DG con el extracto de hojas y con el de tallos respectivamente, no es significativo ($P = 0.08$). Esto parece indicar que tanto el contenido del tallo como el de la hoja son igualmente efectivos en estimular la captación de DG por parte de las células endoteliales, lo que ocasionaría una disminución en los niveles de glucosa sanguínea.

Los experimentos de incubación de células endoteliales con o sin el extracto de *Costus speciosus* con DG indican que hay un aumento significativo en la captación de DG producido por el extracto. La DG es un derivado marcado de glucosa muy conocido para propósitos de estudios de la captación y entrada de glucosa a las células. El efecto del extracto de la planta en la captación y posiblemente en la entrada a las células endoteliales explica el efecto *in vivo* reductor de los niveles de glucosa sanguínea en ratas que se les había inducido diabetes (Figura 2). Los resultados obtenidos sugieren la presencia de uno o varios compuestos farmacológicamente activos en el extracto de *Costus speciosus*. Esto lo confirma el ensayo de biotoxicidad general usando *Artemia salina*. No hay evidencia patológica de que el extracto sea tóxico al hígado o al riñón.

AGRADECIMIENTOS

ALG reconoce el apoyo económico brindado por la Escuela de Medicina "San Juan Bautista". ROG agradece al "Proyecto Farmacia" por su cooperación a este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Hernández L, Muñoz RA, Miró G, Martínez M, Silva-Parra J. y Chaves P. Use of medicinal plants by ambulatory patients in Puerto Rico. *Am. J. Hosp. Pharm.* 41(10):2060-4, 1984.
- 2 Dasgupta B. y Pandey, VB. A new Indian source of diosgenine (*Costus speciosus*). *Experientia*, 26(5):475-6, 1970.
- 3 Singh, S., Sanyal, AK., Bhattacharya, SK. y Pandey, VB. Oestrogenic activity of saponins from *Costus speciosus* (Koen) Sm. *Indian J. Med. Res.*, 60(2):287-90, 1972.
- 4 Bandara, BM., Hewage, CM., Karunaratne, V. y Adikaram, NK. Methyl ester of para-coumaric acid: antifungal principle of the rhizome of *Costus speciosus*. *Planta Med.*, 54(5):477-8, 1988.
- 5 Inoue, K. y Ebizuka, Y. Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 404:57-69, 1996.
- 6 Mosihuzzaman, M., et al. Hypoglycemic effects of three plants from eastern Himalayan belt. *Diabetes Res.* 26(3):127-38, 1994.
- 7 Preston, A. M. Modification of Streptozotocin-Induced Diabetes by Protective Agents. *Nutrition Res.* 5:435-446, 1985.
- 8 Connolly, D. T., Knight, M. B., Harakas, N., K., Wittwer, A., J., and Feder, J. Determination of the Number of Endothelial Cells in Culture Using an Acid Phosphatase Assay. *Anal. Biochem.* 152: 136-140, 1985.
- 9 Olander, J. V., Marasa, J. C., Kimes, R. C., Johnston, G. M., and Feder, J. An Assay Measuring the Stimulation of Several Types of Bovine Endothelial Cells by Growth Factor(s) Derived from Cultured Human Tumor Cells. *In Vitro* 18:99-107, 1982.
- 10 Solís, P. N. Wright., Anderson, M. M., Gupta, M. P. y Phillipson, J.D. A microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.*, 59:250-252, 1993.

Recibido: Noviembre 20 de 2001

Aceptado: Febrero 26 de 2002