

EFEECTO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE *Phyllanthus sellowianus* SOBRE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE GLÓBULOS ROJOS HUMANOS: ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA *IN VITRO*

EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Phyllanthus sellowianus* ON THE VISCOELASTIC PROPERTIES OF HUMAN RED BLOOD CELLS: *IN VITRO* ANTIDIABETIC ACTIVITY

H. Mascaro Grosso¹, P. Buszniez¹, H. V. Castellini² y B. D. Riquelme^{*1,3}

¹Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas – Universidad Nacional de Rosario – Suipacha 535 – (2000) Rosario – Argentina

²Fac. Cs. Exactas, Ingeniería y Agrimensura – Universidad Nacional de Rosario – Pellegrini 250 – (2000) Rosario – Argentina

³Grupo de Física Biomédica – IFIR (CONICET-UNR) – Bv. 27 de febrero 210 bis – (2000) Rosario – Argentina

Recibido: 13/12/2022; Aceptado: 27/02/2023

El *Phyllanthus sellowianus* Müll (Klotzch) Arg. es una planta nativa utilizada popularmente para el tratamiento de la diabetes. Actualmente es de interés evaluar su actividad sobre las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos humanos a fin de elucidar su mecanismo de acción como antidiabético. Para ello se prepararon extractos acuosos por diversas técnicas extractivas. Utilizando el Reómetro Eritrocitario se evaluó el efecto *in vitro* sobre los parámetros viscoelásticos de glóbulos rojos humanos glicados, como ocurre por la hiperglucemia en la diabetes. Los resultados obtenidos sobre el tratamiento con los extractos muestran que afectan la viscoelasticidad eritrocitaria y pueden revertir los efectos de la glicación.

Palabras Clave: *Phyllanthus sellowianus*, viscoelasticidad eritrocitaria, diabetes.

Phyllanthus sellowianus Müll (Klotzch) Arg. is a native plant used for diabetes treatment. It is currently of interest to evaluate its activity on the mechanical properties of human red blood cells to elucidate its mechanism of action as an antidiabetic. For this, aqueous extracts were prepared by various extractive techniques. Using the Erythrocyte Rheometer, the *in vitro* effect on the viscoelastic parameters of glycated human red blood cells, as occurs by hyperglycemia in diabetes, was evaluated. The results obtained from the treatment with the extracts show that they affect erythrocyte viscoelasticity and can reverse the glycation effects.

Keywords: *Phyllanthus sellowianus*; erythrocyte viscoelasticity, diabetes.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2023.34.2.42>



ISSN 1850-1168 (online)

I. INTRODUCCIÓN

El sarandí blanco (*Phyllanthus sellowianus*) es un arbusto hidrófilo de la familia de las filantáceas usado popularmente para el tratamiento de la diabetes. El uso de esta especie como apoyo al tratamiento de la diabetes figura en la Farmacopea Argentina [1], siendo de interés actual el estudio de su mecanismo de acción y su hemocompatibilidad para futuros usos terapéuticos [2, 3]. La diabetes mellitus es actualmente una de las principales amenazas para la salud humana. Esta enfermedad se caracteriza por la hiperglucemia la cual produce la glicación de los glóbulos rojos, alterando sus propiedades mecánicas y de agregación [4, 5]. Estas alteraciones hemorreológicas inducen alteraciones en la microcirculación ocasionando complicaciones como por ejemplo los accidentes cerebrovasculares, la ceguera y el pie diabético.

La glicación que ocurre en los glóbulos rojos por efecto de la hiperglucemia, puede ser satisfactoriamente modelizada *in vitro* a través de diversos protocolos [6, 7].

El objetivo de este trabajo es estudiar las alteraciones de los parámetros viscoelásticos de glóbulos rojos humanos glicados *in vitro* e incubados con extracto de hojas y corte-



FIG. 1: Ejemplar de las hojas y flor de *Phyllanthus sellowianus* recolectado en la ribera del río Nogoyá, Entre Ríos. Argentina.

za de *Phyllanthus sellowianus* obtenidos por distintos métodos de extracción (infusión, cocimiento, digestión y maceración).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Se recolectaron hojas y tallos de árboles de *Phyllanthus sellowianus* en estado adulto (Fig. 1) en el sarandisal que se

* riquelme@ifir-conicet.gov.ar, briquel@fbioyf.unr.edu.ar

encuentra en la zona ribereña de Nogoyá, en el parque Paseo de Los Puentes, Ruta Nacional 12, la planta se encuentra distribuida en la margen del río Nogoyá, Entre Ríos. La recolección se realizó en la primavera (02/03/2019).

Extractos de *Phyllanthus sellowianus*

Se seleccionaron las hojas y leño de *Phyllanthus sellowianus* recolectado, las cuales fueron secadas por método natural y almacenadas en bolsas opacas de papel. Luego, el material seco fue triturado para la preparación de los extractos a una concentración del 5% (Fig. 2). Para ello, se suspendieron 3 g del material vegetal triturado en 57 mL de solución fisiológica, para uso intravenoso (Laboratorio B. Braun Medical S.A; pH 7,4 y 308 mOsm/L) a fin de que tuvieran el pH y la osmolaridad adecuadas para la incubación posterior con los GR humanos. Los extractos se obtuvieron utilizando las siguientes técnicas extractivas:

Maceración (M): El material vegetal se colocó en contacto con el disolvente, dejando actuar durante 12 horas a temperatura ambiente al abrigo de la luz.

Infusión (I): Se llevó el disolvente a ebullición (100°C), y se colocó el material vegetal en contacto con él hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Digestión (D): El material vegetal y el disolvente se colocaron en contacto dentro de un recipiente de vidrio. Luego, el recipiente con su contenido fue colocado a Baño María hasta alcanzar la temperatura de 40°C, la cual fue mantenida durante 20 minutos.

Cocimiento (C): Se colocó el material vegetal en contacto con el disolvente y se llevó a 100°C durante 5 minutos. Se agregó agua destilada a fin de compensar la pérdida por evaporación, y mantener el volumen y la osmolaridad constante.

Luego se procedió al proceso de filtración de los extractos para eliminar impurezas de diámetros superiores a 0,2 μm (Filtros Marca Acrodisc 25 mm), así como también esterilizar las distintas soluciones obtenidas. El proceso de filtración se realizó en tubos estériles y bajo flujo laminar (o mechero), adoptando las precauciones normales para trabajar en condiciones estériles.

Dado que los extractos presentaron características ácidas y osmolaridad fuera del rango [2] de las condiciones fisiológicas necesarias, se procedió a la corrección llevándolos a pH 7,4 y 300 mOsm/L para que pudieran ser enfrentados con glóbulos rojos humanos.

Finalmente, las soluciones fueron fraccionadas, rotuladas adecuadamente y almacenadas a 4°C.

Muestras de glóbulos rojos humanos

Se utilizaron muestras de glóbulos rojos (GR) de dadores sanos ($n = 3$) obtenidas por punción venosa y anticoaguladas con EDTA-K₃. La extracción y el procesamiento de las muestras se realizaron bajo las normas de Bioseguridad e Higiene de la FCByF (UNR) y con el cumplimiento de las correspondientes reglamentaciones de Bioética de las instituciones involucradas (Res. N° 347/2013 de 18 de junio de 2013). Los dadores eran adultos masculinos entre 25 y 35 años de edad, no fumadores y que no consumían ningún tipo de medicación. Las muestras fueron procesadas inmediatamente luego de la extracción y las determinaciones se

realizaron de acuerdo con las recomendaciones Internacionales [1]. La sangre entera fue centrifugada a temperatura ambiente, 5 minutos a 2000 rpm (centrífuga Parawall modelo PWL12T), para separar el plasma autólogo y eliminar la capa leucoplaquetaria. Luego los GR fueron lavados dos veces con solución buffer fosfato (PBS, 7,4, 300 mOsm/L).

Obtención de glóbulos rojos glicosados (GRg)

Una alícuota de los GR lavados fue incubada durante 2 horas en volúmenes iguales con una solución de glucosa (dextrosa, C₆H₁₂O₆, Biopack, Lote: 16882015) al 0,4 g/dL en PBS a fin de simular *in vitro* la hiperglicemia que ocurre en un paciente diabético (de 200 mg/dL), obteniendo los glóbulos rojos glicosados (GRg). Otra alícuota de los GR lavados fue incubada en las mismas condiciones solo con PBS para ser utilizada como control. Luego, ambas muestras fueron lavadas con PBS para el posterior tratamiento con los extractos vegetales.

Incubación de los GR y GRg con los extractos

Las muestras de GR (control) y los GRg fueron incubadas en volúmenes iguales con cada extracto vegetal (M, I, D y C) durante 1 hora con agitación suave y controlada a 37°C. Luego, los eritrocitos control, los glicosados y los tratados con los extractos (GR+M, GR+D, GR+I, GR+C y GRg, GRg+M, GRg+D, GRg+I, GRg+C) fueron lavados con PBS y suspendidos en plasma autólogo al 40% para las determinaciones reológicas.



FIG. 2: Material vegetal triturado y procedimiento de obtención del cocimiento.

Equipamiento y métodos

La evaluación de las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos fue realizada utilizando el Reómetro Eritrocitario por quintuplicado. El Reómetro Eritrocitario [8, 9] se basa en la técnica de difracción láser, es un nuevo instrumento desarrollado en el Laboratorio del Grupo de Física Biomédica del Instituto de Física Rosario (IFIR - CONICET/UNR). Este instrumento en régimen estacionario realiza un ensayo de Carga o Creep, donde se registran los datos luego de arrancar el motor, y un ensayo de Descarga o Relajación, donde se obtienen datos inmediatamente después de detener el motor. A partir de las curvas de carga y descarga obtenidas para cada muestra, se calculan los parámetros característicos al régimen estacionario. Para ello, la curva de descarga obtenida se ajusta a una curva de decaimiento exponencial obteniendo el tiempo de retardo o relajación

(t_r). La parte inicial de la curva de carga se ajusta con una función lineal, teniendo así la pendiente, necesaria para calcular el módulo elástico (μ) y la viscosidad superficial de membrana (η_m). La tensión de corte es un dato del equipo, mientras que la deformación máxima se determina de la curva de carga. Conociendo el valor de la constante elástica es posible conocer el valor de la constante viscosa a través del tiempo de relajación, que se calcula por medio de la curva de descarga. Por lo tanto, a partir de la señal registrada correspondiente a los glóbulos rojos durante el proceso de deformación se determinan los siguientes parámetros relacionados con la capacidad de deformación de los glóbulos rojos sometidos a una tensión de corte estacionaria [10]:

- índice de deformabilidad eritrocitaria

$$ID = \frac{(A_1 - A_3)}{(A_1 + A_3)} \quad (1)$$

donde A_1 y A_3 son las lecturas fotométricas tomadas a lo largo de los ejes mayor y menor del patrón elíptico de difracción.

- módulo elástico de la membrana

$$\mu = \frac{\tau_F S_0}{4 \cdot A_1 \cdot \left(\frac{A_3}{A_1} - \frac{A_1}{A_3} \right)} \quad (2)$$

donde τ_F es la tensión final a la que están sometidos los glóbulos rojos y S_0 es la superficie inicial del eritrocito en reposo.

- viscosidad superficial de la membrana

$$\eta_s = \mu \cdot t_r \quad (3)$$

Siguiendo el protocolo establecido para el uso de este instrumento, se determinaron los parámetros viscoelásticos de los glóbulos rojos controles, los glicados, y los tratados con los distintos extractos.

Análisis estadístico

Las determinaciones fueron realizadas en cada muestra por quintuplicado utilizando el Reómetro Eritrocitario. Todos los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t de Student utilizando el software InfoSAT. Se consideró que las diferencias eran significativas cuando el p-valor de comparación con el Control (correspondiente a los glóbulos rojos incubados solo con PBS) fue $p < 0.05$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los valores medios \pm los desvíos estándares de los parámetros viscoelásticos de los glóbulos rojos glicados (GRg) simulando el efecto que produce la hiperglucemia en la diabetes, e incubados con las distintas soluciones extractivas.

Los resultados de la Tabla 1 no mostraron diferencias significativas con respecto al control en el índice de deformabilidad ni en el módulo elástico de la membrana de los glóbulos rojos para ninguna de las muestras tratadas. Los valores de la viscosidad superficial de membrana de las muestras de

TABLA 1: Parámetros viscoelásticos estacionarios de los glóbulos rojos glicados tratados con *Phyllanthus sellowianus*.

	ID	η_m 10^{-7}N.s/m	μ 10^{-6}N/m
Control	0,62 \pm 0,02	1,8 \pm 0,2	4,8 \pm 0,3
GRg	0,63 \pm 0,02	2,4 \pm 0,2**	4,7 \pm 0,3
GRg+M	0,64 \pm 0,01	1,8 \pm 0,4	4,7 \pm 0,1
GRg+D	0,60 \pm 0,02	2,1 \pm 0,2*	4,8 \pm 0,5
GRg+I	0,61 \pm 0,02	1,6 \pm 0,2**	4,8 \pm 0,5
GRg+C	0,62 \pm 0,02	2,1 \pm 0,3	4,8 \pm 0,5

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

glóbulos rojos glicados (valor indicado en rojo en la Tabla 1) fueron significativamente superiores al control ($p < 0,01$). En cambio, las muestras de glóbulos rojos glicados y tratadas con los extractos de *Phyllanthus sellowianus* presentaron valores de viscosidad superficial de membrana más cercanos al control, especialmente la muestra de glóbulos rojos glicados incubada con el extracto de maceración presentó el mismo valor del control (valor indicado en verde en la Tabla 1).

IV. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento *in vitro* con los extractos de *Phyllanthus sellowianus* revertirían los efectos de la glicación sobre la viscoelasticidad eritrocitaria en situaciones similares a la de la hiperglucemia que ocurre en la diabetes. Por lo tanto, este estudio brindaría información de gran importancia para la comprensión de los mecanismos de acción por los cuales el *Phyllanthus sellowianus*, o sus componentes químicos, son utilizados como antidiabéticos en fitomedicina.

REFERENCIAS

- [1] *Farmacopea Argentina* Buenos Aires, Argentina, 2003.
- [2] P. Buszniez, H. Mascaro, M. Delannoy, O. Di Sapio y B. Riquelme. Caracterización fisicoquímica, óptica y reológica de soluciones extractivas de *phyllanthus sellowianus* y *bauhinia forficata*. *Anales AFA* **28**, 66-69 (2017).
- [3] P. Buszniez, O. Di Sapio y B. Riquelme. Effects of *Phyllanthus sellowianus* Müll Arg. Extracts on the Rheological Properties of Human Erythrocytes. *Cell Biochem. Biophys.* **70**, 1407-1416 (2014).
- [4] B. Riquelme, P. Foresto, M. D'Arrigo y R. Rasia. *Laser diffractometry technique for determination of stationary and dynamics viscoelastic parameters of erythrocyte in vascular pathologies* en *Optical Coherence Tomography and Coherence Techniques* (OSA, 2003), 5140.
- [5] M. Delannoy, A. Fontana, M. D'Arrigo y B. Riquelme. Influence of hypertension and type 2 diabetes mellitus on erythrocyte aggregation using image digital analysis. *Series on Biomechanics* **29**, 5-10 (2015). https://www.imbm.bas.bg/biomechanics/uploads/Archive2015-1/5-10_Delannoy.pdf.
- [6] B. Riquelme, P. Foresto, M. D'Arrigo, J. Valverde y R. Rasia. A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. *J Biochem. Biophys. Meth.* **62**, 131-141 (2005).

- [7] M. V. Batista da Silva, A. I. Alet, H. V. Castellini y B. D. Riquelme. Methods: A new protocol for in vitro red blood cell glycation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Molecular & Integrative Physiology* **264**, 111109 (2022).
- [8] B. Riquelme, H. Castellini y B. Albea. Linear and Non-linear Viscoelasticity of Red Blood Cells using a New Optical Erythrocyte Rheometer. *OSA Technical Digest* (2018).
- [9] B. Riquelme, B. Albea, A. Marenzana y H. Castellini. *Reómetro Eritrocitario* <https://lens.org/002-392-548-778-992>. Patente de Invención AR 091467 B1. 2013.
- [10] B. Albea. *Construcción y validación de un Reómetro Eritrocitario* Tesis lic. (Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, 2016).