

Efecto del Propóleos Chileno sobre el Metabolismo de Glucosa en Ratones Diabéticos

Effect of Chilean Propolis on Glucose Metabolism in Diabetic Mice

*Alejandro Pacheco; **Julio B. Daleprane; **Vanessa S. Freitas; **Simone Ferderbar; ***Sandro Hirabara;
****Alejandro Cuevas; ****Nicolás Saavedra; ***Rui Curi; **Dulcinea S. P. Abdalla & ****Luis A. Salazar

PACHECO, A.; DALEPRANE, J. B.; FREITAS, V. S.; FERDERBAR, S.; HIRABARA, S.; CUEVAS, A.; SAAVEDRA, N.; CURI, R.; ABDALLA, D. S. & SALAZAR, L. A. Efecto del propóleos Chileno sobre el metabolismo de glucosa en ratones diabéticos. *Int. J. Morphol.*, 29(3):754-761, 2011.

RESUMEN: En el presente estudio se evaluó el efecto del propóleos sobre el metabolismo de la glucosa en ratones C57/BL-6 con diabetes mellitus tipo 2 inducida por dieta alta en grasa. Se midieron los cambios en las concentraciones séricas de lípidos, glucosa e insulina, y el efecto sobre la captación de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glucosa, síntesis de [¹⁴C]-glicógeno y descarboxilación de [U-¹⁴C]-D-glucosa inducida por insulina en músculo aislado. Los resultados muestran que en ratones diabéticos, el tratamiento con propóleos (150 mg/kg/día) reduce los niveles de insulina e índice HOMA (P<0.05). También disminuyó la obesidad abdominal de estos animales (P<0.05). Por otro lado, no modificó las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol total y triglicéridos. Se observó también que la captación de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glucosa, síntesis de [¹⁴C]-glicógeno y descarboxilación de [U-¹⁴C]-D-glucosa inducida por insulina en músculo sólo de ratones tratados con propóleos fue significativamente superior al grupo control (P<0.05). En resumen, nuestros datos confirman que el propóleos es capaz de modular el metabolismo de glucosa en ratones C57/BL-6 con diabetes mellitus tipo 2 inducida por dieta alta en grasa. Los datos obtenidos constituyen un importante antecedente que avala el posible uso del propóleos como fuente de polifenoles con actividad antidiabética.

PALABRAS CLAVE: Propóleos; Ratones Diabéticos; Polifenoles; Glucosa.

INTRODUCCIÓN

El estilo de vida moderno marcado por un fácil acceso a fuentes de alimentos hipercalóricos, sumado a una progresiva reducción de actividad física, ha llevado a un incremento en las enfermedades crónicas asociadas a la nutrición, incluyendo el desarrollo de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Zimmet *et al.*, 2001). En Chile, según la Encuesta Nacional de Salud, la prevalencia ha aumentado de un 4,2% a un 9,4% en un lapso de 7 años, transformándose en uno de los principales problemas de salud pública nacional (MINSAL, 2010).

La DM2 se caracteriza por un alza en los niveles de glicemia producto de una acción ineficiente de la insulina

para lograr la incorporación de glucosa al interior de las células (Shulman *et al.*, 2000), siendo uno de los eventos de mayor importancia, el desarrollo previo de insulino resistencia por varios tejidos, en especial por parte de las células musculares estriadas (Magnusson *et al.*, 1992).

La búsqueda de soluciones funcionales y que sean aplicables fácilmente a la población general, ha llevado a enfocar esfuerzos en desarrollar alimentos que incluyan compuestos bioactivos que disminuyan los niveles séricos de glucosa, mejoren la sensibilidad a la insulina o disminuyan la obesidad central. En Chile, los principales tratamientos farmacológicos utilizados durante las primeras etapas de la

* Programa de Doctorado en Ciencias, mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; Programa de Doutorado em Farmacia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil.

** Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil.

*** Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, Universidade de São Paulo, Brasil.

**** Centro de Biología Molecular y Farmacogenética, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile; Núcleo de Desarrollo Científico – Tecnológico en Biorecursos, Universidad de La Frontera (BIOREN-UFRO), Temuco, Chile.

DM2 emplean la metformina. Sus efectos para disminuir la hiperglicemia están bien documentados, tanto en monoterapia como en el tratamiento combinado con otros hipoglicemiantes (Fonseca *et al.*, 2000; Garber *et al.*, 1997). Sin embargo, existe una marcada tendencia a desarrollar un deterioro progresivo en el control glicémico y un abandono del tratamiento, habitualmente motivado por una escasa tolerancia a los malestares gástricos generados por los altos niveles del fármaco requeridos para ejercer su función terapéutica (Brown *et al.*, 2004). Lo anterior ha motivado la búsqueda de alternativas terapéuticas que involucren la activación de las mismas vías metabólicas que la metformina y que no generen los efectos secundarios de ésta. Recientemente, se ha descrito que algunos compuestos polifenólicos han demostrado que son capaces de disminuir la hiperlipidemia en ratones diabéticos mediante la activación de las mismas vías de señalización que la metformina, en un grado variable y dependiente a la estructura de los mismos (Zang *et al.*, 2006). Esta misma variabilidad ha despertado un gran interés en su potencial terapéutico.

Los compuestos polifenólicos son sustancias de origen vegetal que se clasifican según la distribución de los grupos fenólicos y radicales de su estructura. Las principales clases de polifenoles disponibles en los alimentos son los ácidos fenólicos y los flavonoides cuyas principales fuentes son el té, los frutos de tipo berries y algunos bulbos (Hertog *et al.*, 1993; O'Reilly *et al.*, 2001). Tradicionalmente, los compuestos polifenólicos han sido descritos como los antioxidantes más abundantes de la dieta humana (Manach *et al.*, 2004), pero además se ha demostrado que son capaces de modular la expresión génica y la señalización celular (Yuan *et al.*, 2005; Wheeler *et al.*, 2004).

Los productos derivados de las abejas de miel (*Apis mellifera*) también pueden ser una excelente fuente de polifenoles dietarios, ya que resumen una colección de las sustancias presentes en las especies florales que la originan (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). El propóleo es una sustancia gomo-resinosa, producida por las abejas a partir de mucílagos, gomas, resinas vegetales de tipo variado, que además es enriquecida por las propias abejas con saliva y otras secreciones enzimáticas, caracterizándose por lo menos 300 compuestos (Hernández *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2001), entre los cuales, los más abundantes son de origen fenólico; destacando una fuerte variación cuantitativa y cualitativa en la composición de polifenoles, dependiendo también del origen botánico, geográfico y época de recolección de éste (Hernández *et al.*).

Así, con el objeto de verificar si la ingesta de los polifenoles del propóleo afectan el metabolismo de la glucosa en un modelo animal de diabetes inducida por dieta

alta en grasa, se midieron los cambios en las concentraciones séricas de lípidos, glucosa e insulina y el efecto sobre la captación de 2-deoxi-[2,6-3H]-D-glucosa, síntesis de [14C]-glicógeno y decarboxilación de [U-14C]-D-glucosa inducida por insulina en músculo aislado de ratones diabéticos C57/BL-6 tratados con propóleos.

MATERIAL Y MÉTODO

Análisis de Propóleos. Para este estudio se utilizó un propóleo recolectado de la zona cordillerana de la Región de La Araucanía, Chile. Para su análisis se maceraron 30 gramos de propóleos crudo con alcohol etílico 70% hasta completar 100 mL, en un frasco color ámbar por un periodo de 4 días a 37°C en agitación periódica. La muestra fue filtrada para eliminar las impurezas y el sobrenadante se empleó para suplementar el alimento y realizar los análisis cromatográficos, para lo cual se utilizó un cromatógrafo líquido de alta precisión modelo Prominence (Shimadzu, Japón) equipado con tres bombas modelo LC-20AD, inyector automático SIL-20AC, horno para columnas CTO-20AC, controladora CBM-20A, y detector DAD (diode array) SPD-M20A. La separación se realizó en una columna Luna C18 250 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm. Los compuestos fueron eluidos con los solventes A: H₂O, 0,1% ácido fórmico y B: MeOH, 0,1% ácido fórmico con un flujo constante de 1,2 mL/min. Los compuestos fueron leídos a la longitud de onda de 290nm y graficados. La identificación se realizó por comparación de cromatogramas de estándares de quercetina, ácido cafeico, galangina, pinoembrina, apigenina, ácido cafeico fenil éster (CAPE) y resveratrol y por correspondencia de sus espectros UV.

Animales. Fueron utilizados cuarenta ratones C57BL/6 machos, de 6 a 8 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidade de São Paulo, Brasil. Fueron mantenidos en una sala con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, bajo condiciones estandarizadas de temperatura y acceso libre a agua y alimentos. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 2 grupos de 16 y 24 individuos denominados BG y AG, respectivamente. Al grupo BG se le suministró dieta AIN-93M baja en grasa (4%). Al grupo AG se les proporcionó una dieta alta en grasa (24%), equivalente a una tipo DIO (Diet-induced Obesity) de Laboratorios Research Diets, EE.UU. (Cat. n° D12451). Ambas dietas fueron proporcionadas por el laboratorio Nutri-Experimental®, Campinas, Brasil. Después de 9 semanas, se obtuvieron muestras de sangre y una vez confirmada la presencia de diabetes en el grupo AG (glicemia superior a 240 mg/dL según Surwit *et al.*, 1988.), éste fue subdividido en 3 grupos de 8 animales: con alimen-

to sin modificar (AG); con alimento adicionado con extracto evaporado de propóleos (AG-P); y con alimento adicionado con metformina (AG-M). Las raciones fueron preparadas de manera que los ratones consumieran 150 mg/Kg/día de propóleos o metformina basándose en el consumo diario del alimento. Finalizada la semana 15 los animales fueron sacrificados. Se obtuvieron muestras de sangre y se extrajeron los músculos sóleo de cada individuo, los que fueron empleados inmediatamente en el ensayo de captación de glucosa. Además, se extrajo la totalidad de grasa que conformaba el paquete graso epididimal de cada animal, el que fue pesado y luego descartado. El manejo de los animales fue acorde con lo señalado en el Manual de Normas de Bioseguridad del Comité Nacional de Biotecnología de CONICYT, publicado en el año 2008 y el protocolo experimental ejecutado fue aprobado previamente por el Comité de Ética institucional.

Determinaciones Bioquímicas. La sangre obtenida fue colectada en microtubos cónicos de centrífuga. El suero fue obtenido por centrifugación a 600 g por 10 minutos a 4°C y luego fue almacenado en alícuotas a -80°C hasta el momento de realizar las determinaciones. Las concentraciones de glucosa, colesterol total y triglicéridos fueron medidas utilizando métodos enzimático-colorimétricos. Los niveles de insulina se determinaron utilizando un kit comercial específico para insulina de ratón (Linco Research, Missouri, EE.UU.).

Evaluación de la captación de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glucosa, síntesis de [¹⁴C]-glucógeno y decarboxilación de [U-¹⁴C]-D-glucosa inducida por insulina en músculo aislado.

Incubación de tejido. Los músculos sóleo (6 a 8 por grupo) fueron obtenidos inmediatamente después de sacrificar al animal y pre incubados en tampón bicarbonato de Krebs-Ringer (pH 7,4; 5,6mM de glucosa y 1,5% p/v de albúmina de suero bovino) en baño maría a 37°C, 95% O₂ y 5% CO₂, con agitación continua a 120 RPM. Después de 30 minutos fueron transferidos a otros frascos con el mismo tampón previamente calentado a 37°C, adicionado con 0,1 uCi/mL de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glucosa y 0,2 uCi/mL de [U-¹⁴C]-D-glucosa. Los trozos de tejido fueron incubados por una hora en ausencia o presencia de 100 µU/mL de insulina.

Captación de 2-deoxi-[2,6-³H]-D-glucosa. Al final de la incubación, los músculos fueron brevemente lavados en solución salina 0,9% NaCl a 4°C, digeridos en 0,5 mL de KOH 1 M y congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente, 150 µL del extracto fueron transferidos a viales de conteo a los cuales se agregaron 1,5 mL de líquido de cen-

telleo. La radioactividad para ³H y ¹⁴C fue cuantificada por centelleografía líquida en un equipo Beckman LS 7500. La tasa de transporte del análogo no metabolizable de glucosa, 2-Deoxy-D-[2,6-³H] glucosa, fue medida como se describió previamente (Challiss *et al.*, 1986). La acumulación de 2-Deoxy-D-[2,6-³H] glucosa en el espacio intersticial fue corregida a partir de experimentos con el inhibidor inespecífico del transporte de glucosa, floretina. Para esto, bandas de sóleo fueron incubadas en ausencia y presencia de 1mM del inhibidor y cuantificadas de la misma manera.

Síntesis de [¹⁴C]-glucógeno. Para cuantificar la síntesis de [¹⁴C]-glucógeno, a los 350 µL restantes de la digestión con KOH 1 M obtenida en el paso anterior se adicionaron 70 µL de solución saturada de Na₂SO₄ que se agitó por 30 minutos a 37 °C en baño maría y se le adicionó 70 µL de solución de glucógeno de ostra frío (25 mg/mL) para facilitar la precipitación de glucógeno. Posteriormente, se adicionaron 1.05mL de etanol a -20°C, se agitaron los tubos y se refrigeraron a -20°C durante dos horas, luego de lo cual fueron centrifugados por 20 minutos a 2000 RPM a 4 °C. El sobrenadante alcohólico fue retirado y se dejó secar en papel absorbente por aproximadamente 10 minutos. En seguida, el glucógeno fue resuspendido en la menor cantidad de agua posible (400 µL). El volumen contenido en los tubos fue medido y considerado como un factor de dilución. A continuación se transfirieron 180 µL de la solución a un vial y se adicionaron 1,8 mL de líquido de centelleo, esto fue agitado y los tubos dejados en la oscuridad por tiempo igual o mayor a 30 minutos para luego cuantificar la radiactividad por centelleografía líquida en un equipo Beckman LS-7500.

Oxidación de [U-¹⁴C]-D-glucosa. La velocidad de oxidación de glucosa se calcula al medir la producción de ¹⁴CO₂ por los músculos incubados en presencia de [U-¹⁴C]-D-glucosa. Terminada la incubación inicial y de forma paralela al procedimiento de captación de 2-Deoxy-D-[2,6-³H]-glucosa, se adicionó en un compartimento separado 0,4 ml de feniletiamina (amina cuaternaria de elevado peso molecular, usada para atrapar el ¹⁴CO₂ desprendido en forma de carbamato) diluida en metanol (1:1 v/v) impregnada en un papel de filtro. El ¹⁴CO₂ desprendido por el buffer fosfato se recoge en la Feniletiamina durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se retira 100µL del medio y se añaden 1,5 ml de líquido de centello al vial y se cuantifica la radioactividad por centelleografía líquida en un equipo Beckman LS 7500. En cada experimento se procesó un vial sólo con medio de incubación sin los tejidos (blanco de lectura), cuya radioactividad expresa la producción espontánea de ¹⁴CO₂. Los resultados se expresaron como pmol de equivalentes de glucosa oxidada.

RESULTADOS

Al analizar la muestra de propóleos por cromatografía líquida fue posible identificar y cuantificar los siguientes compuestos: pinocembrina, ácido cafeico fenil éster, galangina, quercitina dihidrato, apigenina y ácido cafeico (Fig.1).

En los ratones, después de 9 semanas con dieta alta en grasa (AG), los valores séricos de glucosa, insulina y cálculo de HOMA (Fig. 2) se encuentran elevados en comparación al grupo con dieta baja en grasa (BG), lo que confirmaría la presencia de un cuadro diabético inducido por la dieta hiperlipídica, considerando para ello valores superiores a 240 mg/dL de glucosa plasmática (Surwit *et al.*, 1988).

En relación a los lípidos séricos estudiados durante el mismo periodo (Fig. 3), sólo se encuentran elevados los niveles de colesterol en el grupo AG, no encontrándose diferencias significativas entre los niveles de triglicéridos de los dos grupos.

Después de separados los ratones diabéticos y tratados por 6 semanas con propóleos (AG-P) o metformina (AG-M) se repitieron los análisis. Si bien no se presentaron diferencias significativas en los niveles de glucosa, los niveles de insulina disminuyeron en ambos grupos, lo cual se ve reflejado en la reducción del HOMA de ambos grupos, al ser comparados con el control de dieta sin suplementar (AG) ($p < 0.05$, Fig. 4). Durante este periodo no se presentaron diferencias significativas en los niveles de colesterol total o triglicéridos en ninguno de los grupos estudiados.

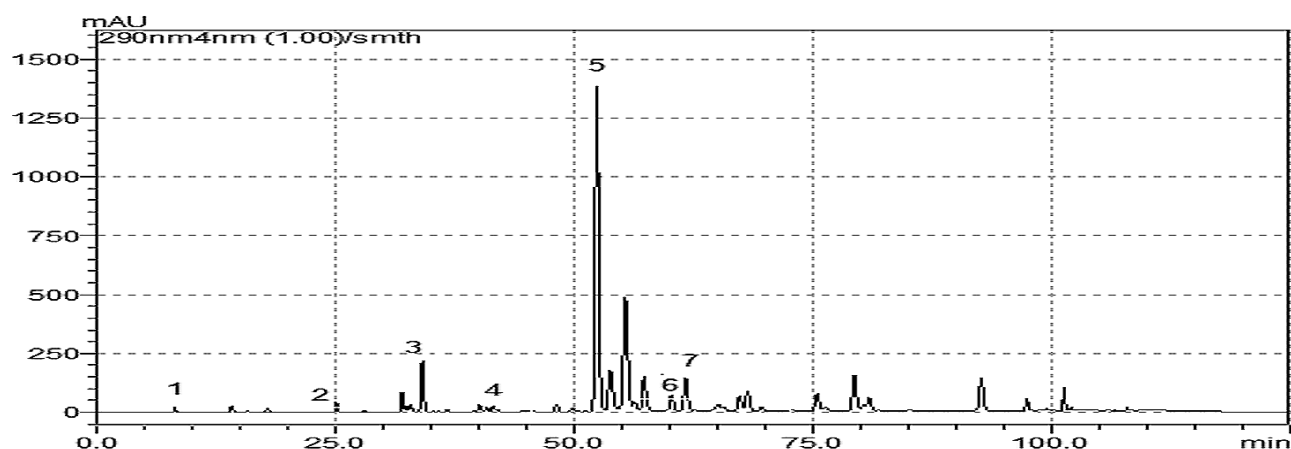


Fig. 1. Cromatograma de propóleos chileno utilizado en este estudio. Longitud de onda: 290 nm, volumen de inyección: 5 µL. Compuestos identificados: 1, ácido cafeico (12,3 µg/mL); 2, resveratrol (0,0 µg/mL); 3, quercitina (75,17 µg/mL); 4, apigenina (31,44 µg/mL); 5, pinocembrina (1006,42 µg/mL); 6, galangina (75,47 µg/mL); 7, ácido cafeico fenil éster (532,63 µg/mL).

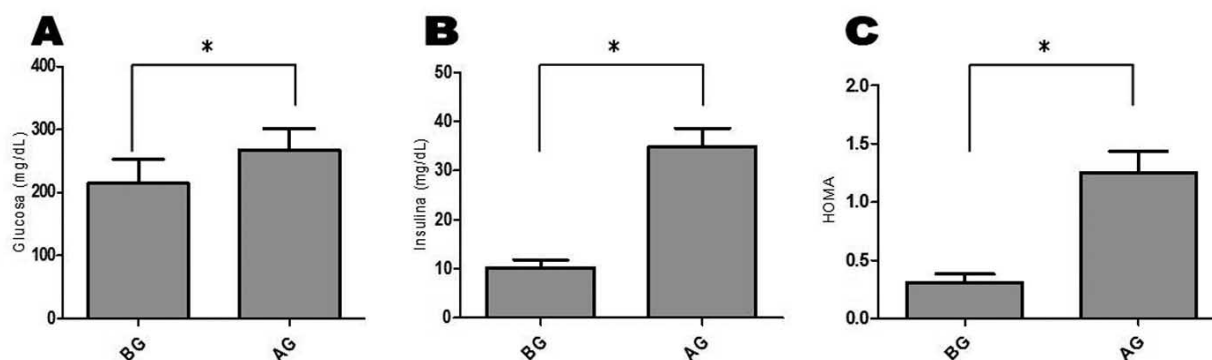


Fig. 2. Concentraciones séricas de glucosa (A), insulina (B) y HOMA (C) en ratones C57BL/6. Todos los parámetros en el grupo con dieta alta en grasa (n=24) se encuentran elevados ($p < 0.05$) al ser comparados con la dieta baja en grasa (n=16). Los valores corresponden al promedio \pm D.E. BG, Dieta Baja en grasa; AG, Dieta Alta en grasa. Test estadístico: t-test; * $p < 0.05$.

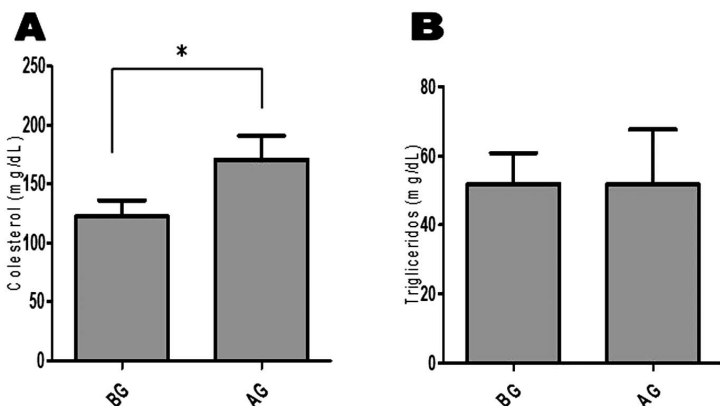


Fig. 3. Niveles séricos de colesterol total (A) y triglicéridos (B) en los grupos estudiados. Los valores corresponden al promedio \pm D.E. El colesterol se encontró elevado en el grupo alimentado con dieta alta en grasa. No se observaron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos. BG, Dieta Baja en grasa; AG, Dieta Alta en grasa. Test estadístico: t-test; * $p < 0.05$.

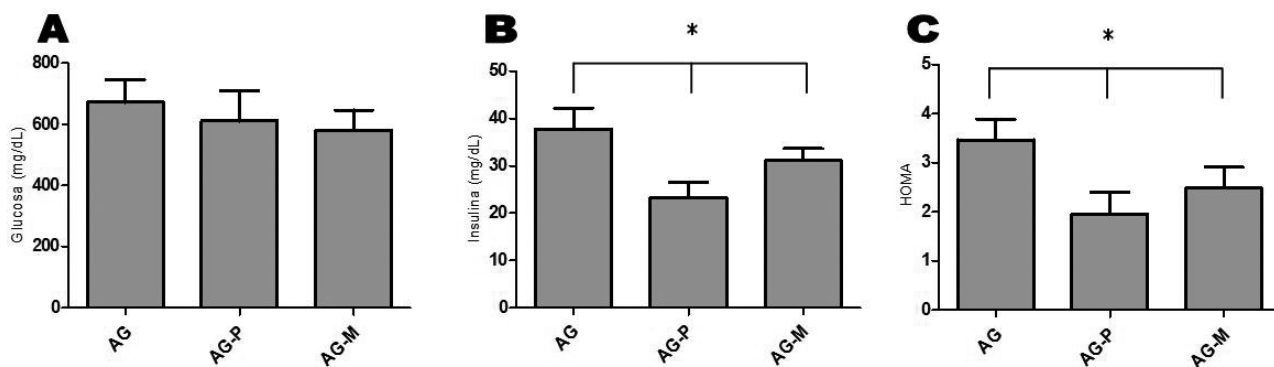


Fig. 4. Concentraciones séricas de glucosa (A), insulina (B) y HOMA (C) en ratones diabéticos posterior a la intervención de la dieta alta en grasa suplementada con propóleo o metformina. Los niveles de insulina y HOMA fueron significativamente menores en los grupos tratados con propóleo o metformina. Los valores corresponden al promedio \pm D.E. de 8 animales por grupo. AG, Dieta Alta en grasa; AG-P, Dieta Alta en grasa + propóleo (150 mg/kg/día); AG-M, Dieta Alta en grasa + metformina (150 mg/kg/día). Test estadístico: ANOVA; Comparaciones múltiples (Test de Tukey); * $p < 0.05$.

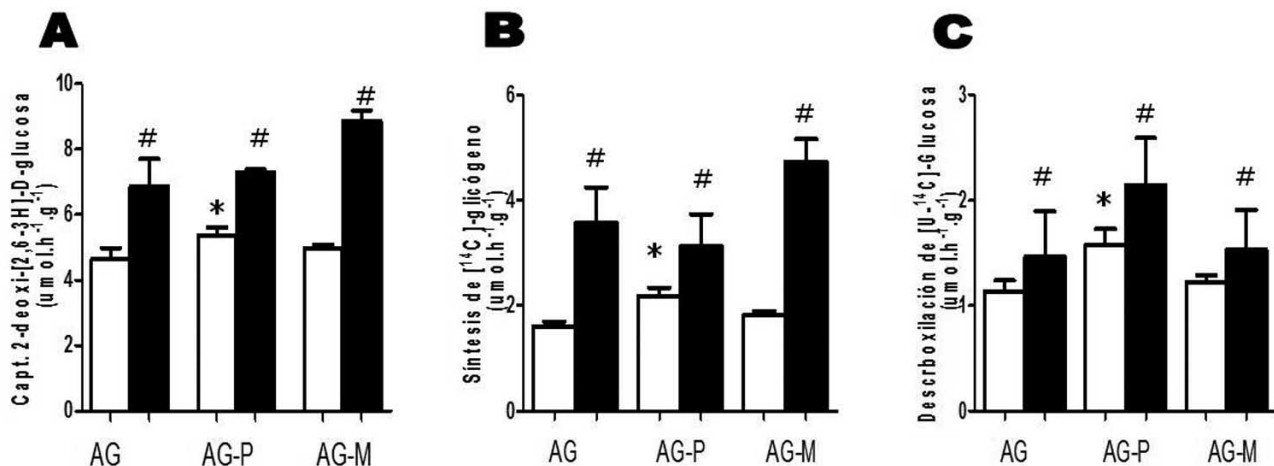


Fig. 5. Captación de 2-deoxy-D-[2,6- ^3H] glucosa (A), Síntesis de $[^{14}\text{C}]$ -Glicógeno (B) y Descarboxilación de $[^{14}\text{C}]$ -Glucosa (C) en músculo sóleo de ratones diabéticos, en condiciones basales (barras blancas) y estimulado con $100\mu\text{U}/\text{mL}$ de Insulina (barras negras). Los valores corresponden al promedio \pm D.E. de 6 a 9 muestras por grupo. AG, Dieta Alta en grasa; AG-P, Dieta Alta en grasa + propóleo (150 mg/kg/día); AG-M, Dieta Alta en grasa + metformina (150 mg/kg/día). Test estadístico: ANOVA; # $p < 0.05$ vs. Condición basal; * $p < 0.05$ vs. Control de dieta (AG).

En la Tabla I se resumen las características morfométricas de los animales al finalizar el estudio. Para evaluar la obesidad abdominal de cada animal, se estimó la relación grasa epididimal/peso final expresado en %. Al comenzar la intervención ninguno de los grupos presentaba diferencias estadísticamente significativas en los niveles de peso corporal.

La captación de glucosa en músculo sóleo (Fig. 5-A)

presenta un marcado incremento al ser incubado con insulina en todos los grupos estudiados, especialmente en el grupo tratado con metformina (AG-M). El mismo patrón se repitió en la síntesis de glicógeno (Fig. 5-B), sin embargo, la descarboxilación de glucosa (Fig. 5-C) no arrojó diferencias estadísticamente significativas para ningún grupo. Cabe destacar que en todos los análisis, el grupo AG-P presentó un valor basal comparativamente superior al del control.

Tabla I. Características morfométricas de los ratones diabéticos al inicio y al final del tratamiento. Valores promedio \pm desviación estándar.

	AG	AG-P	AG-M
Peso al inicio del tratamiento (g)	37,06 \pm 3,90	36,71 \pm 3,74	37,40 \pm 1,48
Peso Final (g)	40,66 \pm 3,99	35,50 \pm 3,37 (*)	39,67 \pm 3,57
Grasa Epididimal (g)	2,26 \pm 0,14	1,45 \pm 0,43 (*)	2,42 \pm 0,091
Obesidad Abdominal (%)	5,63 \pm 0,817	4,25 \pm 0,847 (*)	6,04 \pm 0,389

AG, Dieta Alta en grasa; AG-P, Dieta Alta en grasa + propóleos (150 mg/kg/día); AG-M, Dieta Alta en grasa + metformina (150 mg/kg/día). Test estadístico: ANOVA; * p <0.05.

DISCUSIÓN

La caracterización química del propóleo analizado en este estudio se correlaciona con los hallazgos descritos previamente en Chile, de acuerdo a su procedencia geográfica y botánica (Kumazawa *et al.*, 2003; Dausch *et al.*, 2008). Sin embargo, la firma espectral obtenida por HPLC de cada propóleo es única, variando incluso con la época estacional de recolección (Peña *et al.*, 2008). Cabe destacar la importancia de realizar una identificación y cuantificación de los componentes del propóleo ya que la actividad biológica de los polifenoles varía dependiendo de su configuración estructural, como lo plantean Zang *et al.* (2006) al demostrar diferencias en la actividad biológica de distintos compuestos polifenólicos sobre un mismo blanco. Recientemente Lee *et al.* (2007) han descrito que el ácido cafeico fenil éster (CAPE) tiene la capacidad de inducir la captación de glucosa en cultivos celulares de músculo estriado, mediante la vía de AMPK; este hecho tiene especial relevancia, ya que CAPE es el segundo compuesto en abundancia identificado en la muestra de propóleos en estudio.

Por otra parte, durante el transcurso del experimento, el peso del grupo tratado con metformina no varió respecto al control, tal vez por recibir una dosis relativamente baja, ya que en la literatura es frecuente encontrar tratamientos en ratones C57/BL-6 con concentraciones mayores a 2 veces la empleada en nuestro estudio (Souza-Mello *et al.*, 2010). Esto condicionaría que los efectos de la

metformina en el grupo AG-M no se correlacionen completamente con un tratamiento exitoso a nivel sistémico. No obstante, fue posible observar que los niveles de insulina y el índice HOMA fueron menores en los dos grupos tratados (AG-P y AG-M), aunque se mantuvieron los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol y triglicéridos. Estos hallazgos son similares a los observados por Herrera *et al.* (2010) al tratar ratones C57BL/6 con propóleos en una dieta alta en grasa, sin embargo, en este estudio se emplearon tratamientos con menores concentraciones de propóleos (10 mg/kg/día y 40 mg/kg/día).

En este punto es importante destacar que se haya logrado una mejora de los niveles de HOMA en los ratones de los grupos AG-P y AG-M, lo cual estaría demostrando que los polifenoles del propóleo, al igual que la metformina, poseen la capacidad de modular *in vivo* el metabolismo de la glucosa, mejorando la sensibilidad de los tejidos a los efectos de la insulina.

En el estudio de captación de 2-deoxy-D-[2,6-³H] glucosa, el grupo tratado con propóleos muestra un estado de captación basal de glucosa aumentado en relación al grupo control. Este patrón se repite tanto en síntesis de [¹⁴C]-Glicógeno como en descarboxilación de [¹⁴C]-Glucosa. Esto indicaría que el músculo se encuentra en un permanente estado de incorporación, almacenamiento y oxidación de este sustrato, estimulado, tal vez, por el efecto de la activa-

ción de AMPK por los compuestos polifenólicos descritos anteriormente, lo que se traduciría en un aumento en la cantidad de moléculas de GLUT-4 transportando glucosa al interior de la célula y en un incremento en la actividad de las vías metabólicas que llevan a la oxidación de la misma. De esta manera, estos mismos hechos son los que determinarían que el grupo tratado con propóleo sean los que, proporcionalmente a su condición basal, respondan menos que los otros grupos ante estímulo de insulina, ya que las vías metabólicas involucradas se encontrarían "saturadas" por una permanente activación de AMPK.

Cabe destacar que a la fecha no existen otras publicaciones disponibles que señalen el efecto de los compuestos polifenólicos del propóleo sobre el metabolismo de la glucosa en músculo estriado aislado de ratones C57/BL-6, sin embargo, de acuerdo a nuestros datos, el tratamiento oral con propóleo lograría hacer efecto en uno de los principales tejidos diana para el tratamiento de la DM2. En conclusión, el propóleo estudiado mejora la sensibilidad a la insulina en ratones con diabetes inducida por dieta alta en grasa y aumenta la captación, oxidación y almacenamiento de la glucosa en músculo esquelético aislado.

PACHECO, A.; DALEPRANE, J. B.; FREITAS, V. S.; FERDERBAR, S.; HIRABARA, S.; CUEVAS, A.; SAAVEDRA, N.; CURI, R.; ABDALLA, D. S. & SALAZAR, L. A. Effect of Chilean propolis on glucose metabolism in diabetic mice. *Int. J. Morphol.*, 29(3):754-761, 2011.

SUMMARY: In the current study, we investigated the effect of propolis on diabetic mice undergoing propolis treatment (150 mg/kg/day) for a 6 week period. We also evaluated serum lipids, glucose, insulin levels and the effect on glucose uptake of 2-deoxy-D-[2,6-³H] glucose, [¹⁴C]-glycogen synthesis and [U-¹⁴C]-D-glucose decarboxylation induced by insulin in muscle tissue. Our results show that treatment with propolis (150 mg/kg/day) reduced insulin and HOMA index (P<0.05). Propolis also lowered abdominal obesity (P<0.05). No effects over serum glucose, total cholesterol and triglycerides levels were observed. We also observed that uptake of 2-deoxy-D-[2,6-³H] glucose, [¹⁴C]-glycogen synthesis and [U-¹⁴C]-D-glucose decarboxylation induced by insulin in soleus muscle of mice treated with propolis were significantly greater than control group (P<0.05). In summary, our data establishes that propolis modulates glucose metabolism. This result constitutes important data indicating that propolis can be used as a polyphenols source with antidiabetic activity.

KEY WORDS: Propolis; Diabetic Mice; Polyphenols; Glucose.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brown, J. B.; Nichols, G. A. & Perry, A. The burden of treatment failure in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27(7):1535-40, 2004.
- Challiss, R. A.; Lozeman, F. J.; Leighton, B. & Newsholme, E. A. Effects of the beta-adrenoceptor agonist isoprenaline on insulin-sensitivity in soleus muscle of the rat. *Biochem. J.*, 233(2):377-81, 1986.
- Daugusch, A.; Moraes, C. S.; Fort, P. & Park, Y. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. *Alternat. Med.*, 5(4):435-41, 2008.
- Fonseca, V.; Rosenstock, J.; Patwardhan, R. & Salzman, A. Effect of metformina and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA*, 283:1695-702, 2000.
- Garber, A.; Duncan, T. G.; Goodman, A. M.; Mills, D. J. & Rohlf, J. L. Efficacy of metformin in type II diabetes; results of a double-blind, placebo-controlled, dose-response trial. *Am. J. Med.*, 103(6):491-7, 1997.
- Gómez-Caravaca, A. M.; Gómez-Romero, M.; Arráez-Roman, D.; Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41(4):1220-34, 2006.
- Hernández, M. S.; Lazo, C. S.; Junod, J. M.; Arancibia, J. M.; Flores, R. S.; Valencia, A. E. & Valenzuela, E. V. Organoleptic and physicochemical characteristics of propolis in the Province Of Ñuble, VIII Region-Chile. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 55(4):374-9, 2005.
- Herrera, C.; Fritz, O.; Montenegro, G.; Alvear, M.; Del Sol, M. & Salazar, L. A. Propolis Decrease Diet-Induced Hepatic Steatosis in Mice. *Int. J. Morphol.*, 28:75-84, 2010.
- Hertog, M. G.; Hollman, P. C.; Katan, M. B. & Kromhout, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer*, 20(1):21-9, 1993.

- Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T. & Nakayama, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 51(6):740-2, 2003.
- Lee, E. S.; Uhm, K. O.; Lee, Y. M.; Han, M.; Lee, M.; Park, J. M.; Suh, P. G.; Park, S. H. & Kim, H. S. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 361(4):854-8, 2007.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(5):727-47, 2004.
- Magnusson, I.; Rothman, D. L.; Katz, L. D.; Shulman, R. G. & Shulman, G. I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest.*, 90(4):1323-7, 1992.
- MINSAL, Ministerio de Salud. *Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010*. 2010. Disponible en: <http://www.encuestasalud.cl/>
- Muñoz, O.; Peña, R. C.; Ureta, E.; Montenegro, G.; Caldwell, C. & Timmermann, B. N. Phenolic compounds of propolis from Central Chilean matorral. *Z. Naturforsch. C.*, 56(3-4):273-7, 2001.
- O'Reilly, J. D.; Mallet, A. I.; McAnlis, G. T.; Young, I. S.; Halliwell, B.; Sanders, T. A. & Wiseman, H. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(6):1040-4, 2001.
- Peña, R. C. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cienc. Inv. Agr.*, 35:17-26, 2008.
- Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 106(2):171-6, 2000.
- Surwit, R. S.; Kuhn, C. M.; Cochrane, C.; McCubbin, J. A. & Feinglos, M. N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9):1163-7, 1988.
- Souza-Mello, V.; Gregório, B. M.; Cardoso-De-Lemos, F. S.; De Carvalho, L.; Aguila, M. B. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin. Sci. (Lond)*, 119(6):239-50, 2010.
- Wheeler, D. S.; Catravas, J. D.; Odoms, K.; Denenberg, A.; Malhotra, V. & Wong, H. R. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J. Nutr.*, 134(5):1039-44, 2004.
- Yuan, H.; Gong, A. & Young, C. Y. Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 26(4):793-801, 2005.
- Zang, M.; Xu, S.; Maitland-Toolan, K. A.; Zuccollo, A.; Hou, X.; Jiang, B.; Wierzbicki, M.; Verbeuren, T. J. & Cohen, R. A. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, 55(8):2180-91, 2006.
- Zimmet, P.; Alberti, K. G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865):782-7, 2001.

Dirección para correspondencia:
Prof. Dr. Luis Antonio Salazar
Departamento de Ciencias Básicas,
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera
Av. Francisco Salazar 01145.
Casilla 54-D
Temuco
CHILE

Tel.: +56 45 592 895;
Fax: +56 45 592 832

Email: lsalazar@ufro.cl

Recibido : 09-05-2011
Aceptado: 22-06-2011