



Evaluación de los extractos de *Amaranthus caudatus* (Amaranto), *Lupinus mutabilis* (Tarwi) y *Linum usitatissimum* (Linaza), sobre la hiperglicemia inducida por aloxano en ratones

Evaluation of the extracts of *Amaranthus caudatus* (Amaranto), *Lupinus mutabilis* (Tarwi) and *Linum usitatissimum* (Linaza), on the Alloxane-induced hyperglycemia in mice

GUTIERREZ DURÁN, MARÍA DEL PILAR¹
MAMANI MAYTA, DEYSI DANITZA¹
GONZALES DÁVALOS, EDUARDO^{1*}

FECHA DE RECEPCIÓN: 20 AGOSTO DE 2019

FECHA DE ACEPTACIÓN: 19 DE SEPTIEMBRE DE 2019

Resumen

La prevalencia de diabetes mellitus se incrementa en todo el mundo alcanzando a 592 millones de diabéticos el año 2035; así mismo la OMS proyecta que las muertes por diabetes se dupliquen entre los años 2005 y 2030 (OMS, 2016).

En Bolivia la medicina tradicional reporta plantas medicinales a las cuales se les ha atribuido propiedades hipoglucemiantes, sin embargo en muchos casos no existen estudios científicos que avalen dichas propiedades. Este estudio se ha realizado con la finalidad de evaluar el efecto de los granos de *Amaranthus caudatus* (amaranto), *Linum usitatissimum* (Linaza) y *Lupinus mutabilis* (tarwi) sobre la hiperglicemia inducida por aloxano en animales de experimentación. Se administró por vía oral a ratones con hiperglicemia (glicemia > 180,6 mg/dl)

Abstract

The prevalence of diabetes mellitus increases worldwide reaching 592 million diabetics in 2035; Likewise, the WHO projects that deaths due to diabetes double between the years 2005 and 2030 (WHO, 2016).

In Bolivia, traditional medicine reports medicinal plants to which hypoglycaemic properties have been attributed, however in many cases there are no scientific studies to support these properties. This study was carried out with the purpose of evaluating the effect of *Amaranthus caudatus* (amaranth), *Linum usitatissimum* (Linseed) and *Lupinus mutabilis* (tarwi) on the hyperglycemia induced by alloxan in experimental animals. Mice with hyperglycemia (glycemia > 10 mmol/L) were administered a dose of 2000 mg/kg body weight orally of each hydro-ethanolic extract obtained from the

1. Area de Farmacología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas "Luis Enrique Terrazas Siles". Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.

* Correspondencia eduardo.gonzales@gmail.com

una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal de cada extracto hidro-etanolico obtenido de los granos de *A. caudatus*, *L. usitatissimum* y *L. mutabilis*. Los niveles de glucosa fueron medidos antes y después de la administración de los extractos.

Los extractos hidro-etanolicos disminuyeron de forma significativa ($p < 0.05$) la glucosa plasmática a las cuatro y dos horas después de su administración. El extracto de *A. caudatus* disminuyo la glucosa plasmática de 380 mg/dl a 260 mg/dl, el extracto de *L. mutabilis* disminuyo la glucosa plasmática de 310 mg/dl a 167 mg/dl, y el extracto de *L. usitatissimum* disminuyo la glucosa plasmática de 210,57 mg/dl a 168,14 mg/dl. Siendo el extracto de *L. mutabilis* el que presento mayor actividad sobre la hiperglicemia inducida por aloxano.

PALABRAS CLAVE

Hiperglicemia, aloxano, *Amaranthus caudatus*, *Lupinus mutabilis*, *Linum usitatissimum*

grains of *A. caudatus*, *L. usitatissimum* and *L. mutabilis*. Glucose levels were measured before and after the administration of the extracts.

The hydro-ethanol extracts significantly decreased ($p < 0.05$) the plasma glucose at four and two hours after its administration. The extract of *A. caudatus* decreased the plasma glucose from 380 mg / dl to 260 mg / dl, the extract of *L. mutabilis* decreased the plasma glucose from 310 mg / dl to 167 mg / dl, and the extract of *L. usitatissimum* decreased Plasma glucose from 210.57 mg / dl to 168.14 mg / dl. The extract of *L. mutabilis* was the one with the highest activity on the hyperglycemia induced by aloxan.

KEY WORDS

Hyperglycemia, aloxan, *Amaranthus caudatus*, *Lupinus mutabilis*, *Linum usitatissimum*

INTRODUCCIÓN

La inducción de la diabetes en animales de estudio se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales. El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético. Uno de los agentes más utilizados es el aloxano, análogo tóxico de la glucosa, que destruye selectivamente las células pancreáticas productoras de insulina (células beta) cuando se administra a roedores y muchas otras especies de animales. Además los modelos animales han sido indispensables para la elucidación celular y bases moleculares de la diabetes tipo 1 y tipo 2 en la segunda mitad del siglo pasado.

Desde el descubrimiento de la insulina por Banting y Best en 1822 la diabetes mellitus se considera una enfermedad paradigmática que en modelos animales han dado un gran avance terapéutico, además este avance dependía de estudios anteriores con la experimentación animal Claude Bernard (1849), Oskar Minkowki y Joseph Von Mehring (1889), lo que indica que la diabetes mellitus es un enfermedad del metabolismo causada principalmente por un mal funcionamiento del páncreas.

A pesar del enorme progreso de la investigación realizada hasta el momento la diabetes sigue siendo una importante amenaza para la vida. Sin em-

bargo la mayoría de la experimentación necesaria para la invención y la prueba de nuevos enfoques terapéuticos se ve limitada en los seres humanos por ello se recurre a los modelos animales adecuados. (Hans y col., 2012).

En este trabajo se investiga la actividad de las especies vegetales *Amaranthus caudatus* (Amaranto), *Lupinus mutabilis* (Tarwi) y *Linum usitatissimum* (Linaza), sobre la hiperglicemia inducida con aloxano en ratones de experimentación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal

Amarantus caudatus: (amaranto grano entero) fue recolectado de la localidad de Tomina, con la colaboración del Ing. Gonzales. La Provincia de Tomina se encuentra en el departamento de Chuquisaca a 2300 m.s.n.m. Latitud -192667, longitud -64,55, al Norte limita con Belisario Boeto y Zudañez, al Sur con Azurduy y Hernando Siles, al este con Luis Clavo y al oeste con Zudañez y Azurduy.

Lupinus mutabilis (tarwi grano entero) fue recolectado de la localidad de Ancoraimes capital de la segunda sección de la Provincia Omasuyos, está a una altura de 3812 m.s.n.m., ubicada cerca del Lago Titicaca Limita al norte con las provincias de Camacho, Ildefonso Estanislao de las Muñecas y Larecaja, al oeste y al sur con el lago Titicaca y al este con la provincia de Los Andes. Los cultivos de Tarwi se encuentran a 2 Km de las orillas del Lago Titicaca (Coordenadas GPS: S15°55'19,3" y W 68°53'50,1").

Linum usitatissimum: (linaza grano entero) fue obtenida de la ciudad de La Paz procedente de la ciudad de Cochabamba de Aiquile, localidad de la región central de Bolivia, ubicada en el departamento de Cochabamba. Se sitúa a 217 km al sudeste de la ciudad de Cochabamba y es capital de la provincia de Campero, con una latitud de 18°12'15"S, y una longitud de 65°10'50"W. La altura que se registra en el centro del pueblo es de 2.250 msnm.

Obtención del extracto

Los granos enteros de las especies vegetales fueron molidos y llevados a maceración por 24 horas en etanol al 70 %. El etanol fue evaporado a presión reducida en rotaevaporador (Heidolph Laborota 4000) y liofilizado en un liofilizador (Christ Apha 2-4 LD).

Animales de experimentación

El estudio se realizó con ratones machos Swiss con un peso de 15±2g obtenidos del Bioterio de la Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas UMSA. Todos los animales fueron mantenidos en cajas de polipropileno en una habitación a temperatura controlada a 23±1°C con un ciclo de 12 horas luz/12

horas oscuridad. Los animales fueron alimentados con una dieta normal libre, y aclimatados durante una semana antes de comenzar el experimento.

Inducción de la diabetes

La diabetes fue inducida por la inyección de una sola dosis de 150 mg/Kg de aloxano vía intraperitoneal, en ratones con ayunas de 18 horas, previamente se midió el valor de la glicemia. Después de 3 días de haber recibido la inyección de aloxano, se procedió a medir la glicemia nuevamente, se tomó en cuenta para la experimentación los animales que presentaron una glicemia mayor a 180.6 mg/dl (10 mmol/L). Se administraron los tratamientos a los ratones diabéticos y se tomaron las muestras a los 60, 120 y 240 minutos, después de la administración de cada tratamiento.

Administración de los tratamientos

Los animales fueron divididos en seis grupos de seis animales cada uno. Los extractos y la glibenclamida fueron disueltos en un vehículo que contiene agua destilada. El vehículo solo sirvió como control, la glibenclamida en una dosis de 5 mg/Kg se utilizó como control positivo.

Grupo I C (-): ratones normales tratados con el vehículo (agua destilada).

Grupo II C (d): ratones diabéticos tratados solo con el vehículo.

Grupo III (Am): ratones diabéticos tratados con extracto de *Amaranthus caudatus* (2000 mg/Kg).

Grupo IV (Ln): ratones diabéticos tratados con extracto de *Lupinus mutabilis* (2000 mg/Kg).

Grupo V (Tw): ratones diabéticos tratados con extracto de *Linum usitatissimum* (2000 mg/Kg).

Grupo VI C (+): ratones diabéticos tratados con glibenclamida (5 mg/kg)

La medición de valores de glicemia fue realizada mediante el uso de tiras reactivas, tomando la muestra de sangre de la cola del animal de experimentación. Todos los tratamientos fueron administrados por vía oral.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm SEM. La diferencia estadística entre los grupos se realizó mediante análisis de una vía de la varianza (ANOVA). La diferencia en los valores de $p < 0,01$ fueron considerados significativos. Los datos fueron analizados utilizando Graph Pad InStat Software (CA, EE.UU.).

RESULTADOS

La inducción de diabetes con aloxano provoco reacciones adversas en los ratones como ser hiperglicemia (polidipsia, poliuria) y pérdida de peso. Los resul-

tados muestran una elevación significativa ($p < 0.01$) de glucosa plasmática del grupo control diabético respecto del grupo control negativo. En el caso de la Linaza (*Linum usitatissimum*) hubo diferencia significativa ($p < 0.01$) a las 2 y 4 horas respecto del mismo grupo a la hora después del tratamiento a una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal. El extracto de Tarwi (*Lupinus mutabilis*) solo presentó una diferencia significativa a la cuarta hora después de su administración de la misma manera que el extracto de Amaranto (*Amaranthus caudatus*) (Figura 1).

Figura 1. Evaluación de los extractos hidro-etanólicos de Tarwi (*Lupinus mutabilis*), Amaranto (*Amaranthus caudatus*), Linaza (*Linum usitatissimum*) en la inducción de diabetes con aloxano en ratones

Según los resultados obtenidos se puede observar que después de la ad-

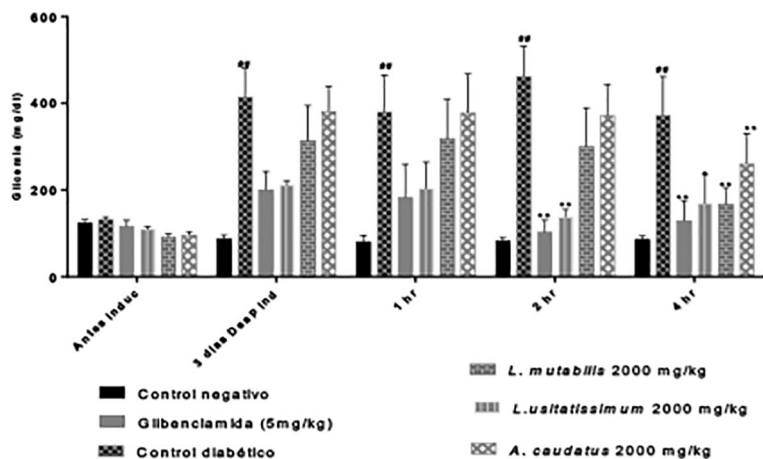


Figura 1. Valores expresados como media \pm SEM ($n=6$) Anova y test de Dunnet. Los asteriscos (*) indican la significancia estadística ($p < 0.01$) comparada con el mismo grupo una hora después del tratamiento. El símbolo # indica la diferencia estadísticamente significativa con el grupo diabético antes de la inducción.

ministración por vía oral de los extractos hidro-etanólicos de los granos de *A. caudatus*, *L. mutabilis* y *L. usitatissimum* los niveles de glucosa plasmática con relación al valor de la glucosa después de la inducción de la diabetes disminuyeron. Sin embargo, este efecto es más evidente a las 2 y 4 horas después del tratamiento con el extracto hidro-etanólico de *L. mutabilis* ($p < 0,01$). El extracto hidro-etanólico de *Amaranthus caudatus* solo presentó significancia a las 4 horas con un valor ($p < 0,01$). Por otra parte el extracto hidro-etanólico de *L. usitatissimum* presentó una diferencia significativa ($p < 0,01$) a la segunda y cuarta hora después de su administración. El grupo control positivo (glibenclamida 5mg/kg) presentó disminución de la glicemia de manera significativa desde la segunda hora después de su administración.

DISCUSIÓN

Aloxano es uno de los compuestos orgánicos más antiguos con nombre que existen. El modelo de inducción de la diabetes con aloxano fue descrito por primera vez en conejos por Dunn, Sheehan y Mclethie en 1943. (Dunn y col., 1943).

Aloxano y STZ son análogos tóxicos de la glucosa que se acumulan preferentemente en las células beta del páncreas a través del transportador de glucosa GLUT2 en presencia de tioles intracelulares especialmente el glutatión. Aloxano genera especies reactivas (ROS) de oxígeno en una reacción redox cíclica con su producto de reacción que es el ácido dialúrico. La autooxidación del ácido dialúrico genera radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y en una etapa de la reacción catalizada por Fe genera radicales hidroxilo, estos radicales son los responsables de la muerte de las células beta. Como un reactivo de tiol, aloxano también inhibe selectivamente la secreción de insulina inducida por glucosa a través de su capacidad para inhibir la célula beta. La respuesta clínica a una dosis diabetogénica de aloxano tiene 3 respuestas:

La primera se presenta dos o tres horas después y se caracteriza por un estado hiperglicémico asociado a la glucogenólisis inducida por adrenalina.

La segunda se presenta de seis a doce horas se distingue hipoglicimia por liberación de insulina preformada en las células beta.

Por último, después de 18 a 24 horas con pérdida total de las células beta que conlleva a una hiperglucemia.

Las lesiones extrapancreáticas producidas por aloxano incluyen alteraciones en los riñones, glándulas suprarrenales tiroides, hipófisis e hígado. Estas se relacionan con las dosis aplicadas. Tales cambios se observan con diversos grados de inflamación, vacuolinización y necrosis en túbulos contorneados, estos cambios son reversibles en los animales que sobreviven (Lenzen, 2008).

La especie vegetal *Amaranthus caudatus* es una hierba que se usa ampliamente en la medicina tradicional, sus usos medicinales bien conocidos son como antihelmíntico, astringente, diurético. In vitro se reportó que las semillas poseen un efecto antioxidante y produjeron la inhibición de la enzima β -amilasa (Gian y col., 2005). *A. caudatus* mostró también propiedades antiaterosclerótica (Kabiri y col., 2010) y antihelmíntico (Ashok y col., 2010).

La reducción de la glicemia podría deberse a la presencia de 20% de proteína, los ocho aminoácidos esenciales (alta en lisina, treonina y triptófano), vitaminas, calcio y minerales (Raj y col., 2003) en el extracto hidro-etanólico de *A. caudatus*. Los flavonoides son uno de los grupos más numerosos de compuestos presentes en las especies vegetales y de amplia propagación entre los compuestos fenólicos en plantas superiores (Carini y col., 2001). Algunos de ellos, debido a su estructura fenólica, se sabe que están implicados en el proceso de terapia de las enfermedades mediadas por radicales libres como la diabetes (Czinner y col., 2000).

La linaza es la fuente más rica en lignanos dietéticos (secoisolariciresinol diglucósido), que ha demostrado que retrasa el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 en modelos animales, pudiendo deberse a la acción que implica la inhibición de la α -amilasa pancreática por los lignanos derivados de la linaza que, por lo tanto podrían constituir un prometedor nutraceutico para la prevención y el tratamiento de la DM2 (Christophe y col, 2013).

Investigaciones previas *in vivo* demostraron que compuestos presentes en *Lupinus spp.*, como la γ -conglutina y alcaloides causan importantes efectos metabólicos, uno de estos compuestos es una proteína que ha demostrado unirse de forma específica a la insulina y provocar efectos hipoglucémicos en ratas sometidas a una sobrecarga de glucosa (Chiara y col., 2004). Otras investigaciones reportaron que los alcaloides quinozolidínicos de *Lupinus* inducen el incremento de insulina desde las células pancreáticas de ratas normales (García y col., 2004; Zambrana y col., 2018).

Varias investigaciones con los extractos de estas especies vegetales informan que tienen muchos efectos, tales como reducir el colesterol, efectos inmunopotenciadores, antitumorales, antioxidantes, y efecto hipoglucémicos.

CONCLUSIONES

Este estudio mostró que la inducción de diabetes con aloxano en ratones produce hiperglicemia. La administración de los diferentes extractos disminuyó los valores de glicemia respecto de los grupos inducidos con diabetes, pero no llegaron a alcanzar valores normales comparados con el grupo antes de la inducción.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado al proyecto UMSA-IDH 2016 "Investigación de propiedades medicinales de productos nutraceuticos como tratamiento coadyuvante en diabéticos y/u obesos, La Paz" desarrollado en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés y el Proyecto Diabetes tipo 2: nuevas terapias UMSA-ASDI.

REFERENCIAS

- Ashok BS, Lakshman K, Jayaveera KN, Manoj RD (2010). Comparative *in vitro* anthelmintic activity of three plants belongs to Amaranthaceae. Arch Biol Sci, 62(1):185-189.
- Carini M, Adlini G, Furlanetto S, Stefani R, Facino RM (2001). LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of poly phenol anti oxidants from *Helichrysum stoechas*. J Pharm Biomed, 24:517-526.
- Chiara Magni C, Fabio Sessa F, Elena Accardo E, Marco Vanoni M, Paolo Morazzoni P, Alesio Scarafoni A *et al.* Conglutin (2004). A lupin seed protein, binds insulin *in vitro* and reduce plasma glucose levels of hyperglycemic rats. Review Article J Nutr Biochem, 15 (11): 646-650.
- Christopher Hano, Sullivan Renouard, Ronald Molinié, Cyrielle Corbin, Esmatullah Barakzoy, Joel Doussot, Frédéric Lamblin, Eric Laïne (2013). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) extract as well as (+)-secoisolariciresinol diglucoside and its mammalian derivatives are potent inhibitors of α -amylase activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23(10): 3007-3012.
- Czinner E, Hagymasi K, Blazovics A, Kery A, Szoke E, Lemverkovics E (2000). *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L) Moench. J Ethnopharmacol: 73:437-443.
- Dunn, J. S.; Sheehan, H. L.; McLetchie, N. G. B (1943). "Necrosis of Islets of Langerhans". The Lancet, 241 (6242): 484-487.
- García López PM, de la Mora PG, Wysoccka W, Maiztegui B, Alzugaray ME, Del Zotto H (2004). Alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. Eur J Pharmacol, 504 (1-2): 139-42.
- Gian FC, Monica RL (2005). *In vitro* antioxi-



- dant effect and inhibition of α - amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. Biol Pharm Bull, 28(6):1098–1102.
- Hans G, Hadi A, Annette S (2012). Animal models in diabetes research. Springer, 325 (11):47-57.
- Kabiri N, Asgary S, Madani H, Mahzouni P (2010). Effect of *Amaranthus caudatus* extract and lovastatin on atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. J Med Plant Res, 4(5):355–361.
- Lenzen, S (2008). "The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin-induced Diabetes". Diabetología, 51(2): 216-226.
- Organización Mundial de la Salud (2016). <http://www.who.int/diabetes/es/>
- Raj K, Jain S, Agrawal S (2003). Herbal medication-an alternative curative system among Bhilsin Udaipur district. Anthropologist, 5(3):141–147.
- Zambrana S, Lunsqvist L, Mamani O, Catrina S, Gonzales E, Ostenson C (2018). Lupinis mutabilis extract exerts an anti-diabetic effect by improving insulin release in type 2 diabetic Goto- Kakizaki rats. Nutrients, 10, 933.
- Zambrana S, Lunsqvist L, Veliz V, Catrina S, Gonzales E, Ostenson C (2018). *Amaranthus caudatus* stimulates insulin secretion in Goto Kakizaki, a model of diabetes mellitus type 2 Nutrients, 10, 94.