

Título: El extracto acuoso de *Ocimum tenuiflorum* disminuye los niveles de glucosa en sangre de tilapias (*Oreochromis niloticus*) con hiperglucemia inducida.

Autores: DrC. Amilcar Arenal Cruz (amilcar.arenal@reduc.edu.cu), MSc. Leonardo Martín Martín, MSc. Néstor M. Castillo Duque de Estrada, MSc. Dainier de la Torre Isla, Lic. Ubaldo Roberto Torres Romo y MSc. Reinaldo González González.

Centro de procedencia del autor principal: Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Morfofisiología Universidad de Camagüey Km 5 1/2 74650, Cuba.

Palabras clave: *tenuiflorum*, *Ocimum*, modelo de peces, diabetes mellitus, fitoterapia, tilapia.

**PREMIO EN LA INSTANCIA PROVINCIAL DEL CONCURSO AÑO 2013.
CATEGORÍA ARTÍCULO CIENTÍFICO**

Resumen.

Objetivo: El objetivo del presente estudio fue evaluar, en tilapias (*Oreochromis niloticus*) con hiperglucemia, el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *Ocimum tenuiflorum*. **Métodos:** La hiperglucemia en *O. niloticus* fue inducida por la adición de glucosa a los peces al agua del estanque. Un extracto acuoso de *Ocimum tenuiflorum* se preparó por ebullición de hojas frescas. Se evaluaron las dosis de extracto 0, 40, 80, 200 y 400 mg por litro de agua del estanque. **Resultados:** La concentración de glucosa en sangre en tilapias con hiperglucemia inducida fue un promedio de 50% mayor que el grupo control. Los niveles de glucosa en sangre en tilapias, después de la inducción de la hiperglucemia, fueron más altos que en el grupo control durante 90 minutos después del tratamiento. El tratamiento con el extracto acuoso de *O. tenuiflorum* disminuyó los niveles de glucosa en suero de tilapias hiperglucémicas hasta que fue similar a la del grupo

de control y fue dependiente de la dosis. Conclusión: Los resultados indicaron que *O. tenuiflorum* contiene actividad hipoglucemiante. Para nuestro conocimiento, este es el primer informe sobre el uso de peces como un modelo de diabetes de probar los extractos naturales de plantas.

1. Introducción:

Actualmente hay más de 346 millones diabéticos en todo el mundo y esta cifra es probable que aumente en un 50% o más en el año 2020 debido al aumento de un estilo de vida sedentario, el consumo de dietas ricas en energía, y la obesidad (1). Proporcionar asistencia sanitaria médica moderna en todo el mundo sigue siendo un objetivo lejano, debido a las limitaciones económicas. Por lo tanto, es necesario seguir buscando nuevos medicamentos más eficaces, y la fitoterapia puede ser un objetivo ideal (2).

Aunque los suplementos naturales son ampliamente utilizados en todo el mundo para tratar la diabetes, algunos de ellos han sido científicamente validados (3). La validación de la efectividad de las hierbas y otras plantas medicinales para el tratamiento de la diabetes en modelos animales de mamíferos no tiene prioridad y es muy costoso, lo que resulta en un vacío en el proceso de desarrollo de fármacos. Los peces son organismos que como modelo vertebrado puede cerrar esta brecha. Recientemente, el pez cebra se ha propuesto como un modelo para la regulación de los niveles de glucosa, mediante la exposición de organismos adultos y de larvas a compuestos con actividad hipoglucemiante conocida (4).

Ocimum tenuiflorum (*Ocimum sanctum*), un miembro de la familia *Lamiaceae* (Labiatae), es una hierba tropical, de hasta 18 centímetros de alto, que se extiende como un arbusto bajo. La planta crece en forma silvestre en Cuba, pero también es ampliamente cultivada en los jardines. El extracto acuoso de *O. tenuiflorum* se usa como hipoglucemiante en Cuba (5). En este estudio se investigó el efecto del extracto de *O. tenuiflorum* acuoso en el nivel de glucosa en sangre en tilapias (*Oreochromis niloticus*) como un nuevo modelo, en peces, para la diabetes.

2. Materiales y métodos

2.1 Peces

El Departamento de Pesca de Camagüey, Cuba suministró tilapias jóvenes (*Oreochromis niloticus*) con peso $46,6 \pm 4,8$ g. Los animales se mantuvieron en el laboratorio a 27 ± 2 ° C en agua aireada y en foto-períodos con duración 14 h de luz: 10 h oscuridad. Fueron alimentadas *ad libitum* con pellets para peces con 30% de proteína (Malta Cleyton-, México).

2.2 Inducción de la hiperglucemia en tilapia

Se prepararon cinco grupos con siete animales en cada uno. Se mantuvieron en el estanque de agua durante 30 minutos. Las concentraciones de glucosa utilizadas fueron 0, 25, 50, 75 y 100 g / L. Luego los peces se pasaron a agua limpia y se les tomaron las muestras de sangre.

2.3 Curso temporal hiperglucémico en tilapia

Se organizaron dos grupos con 45 animales cada uno. Uno de los grupos fue utilizado como control y al otro se le indujo hiperglucemia mediante la adición de glucosa al estanque de los peces a 50 g / L. Los peces se mantuvieron durante 30 minutos en esas condiciones y se tomaron muestras de sangre a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Después los peces se pasaron a agua limpia. Se tomaron muestras de sangre también antes de la inducción de la hiperglucemia.

2.4 La planta y la preparación del extracto

Las plantas de *O. tenuiflorum* se recogieron en el organopónico "La Victoria", Carretera Central, La Habana, Cuba, y fue identificado por el profesor Jorge E. Gutiérrez del Departamento de Botánica de la Universidad de La Habana, Cuba. Una muestra fue depositada en la colección del herbario del Jardín Botánico Nacional, La Habana, Cuba (ejemplar de muestra no. HAJB 87 101).

El extracto acuoso fue preparado por ebullición, durante 15 min, de 120 g de hojas frescas en aproximadamente 1 L de agua destilada. El extracto se filtró, se ajustó el volumen a un litro y se utilizó inmediatamente. Parte del extracto se colocó en el horno (40 ° C) para determinar el peso en seco.

2.5 Evaluación del extracto *O. tenuiflorum*

Se organizaron cuatro grupos con siete animales cada uno. Un grupo, sin tratamiento, se usó como control y se indujo hiperglucemia en los otros tres durante 30 minutos de incubación con glucosa a una concentración de 50 g / L. Luego los animales fueron trasladados a agua limpia. Los animales del segundo grupo se inyectaron con la insulina humana (Roche). El tercer grupo se incorporó a un estanque con el extracto de *O. tenuiflorum* a 200 mg/L. El último grupo permaneció en agua limpia sin tratamiento adicional. Después de 1 hora se tomaron muestras de sangre a todos los animales.

2.6 Prueba de dosis de extracto *O. tenuiflorum*

Se organizaron seis grupos con siete animales cada uno. Un grupo, sin tratamiento, se usó como control y se indujo hiperglucemia en los otros cinco. Después de 30 minutos de incubación con glucosa a 50 g / L los animales fueron trasladados a agua limpia. Cada grupo fue tratado con las dosis de extracto de hoja *O. tenuiflorum* 0, 40, 80, 200 y 400 mg / L respectivamente. El último grupo se incubó en agua limpia sin tratamiento adicional. Después de 1 hora se tomaron muestras de sangre a todos los animales.

2.7 Las muestras de sangre y las mediciones de glucosa en suero

Se extrajo, de la vena caudal de cada pez, cerca de 150 μ L de sangre. Las muestras se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se obtuvo el suero por centrifugación a 2000g durante 5 min. Los niveles de glucosa fueron estimadas por fotolorimetría con el uso de un juego de reactivos disponible comercialmente basado en el método de glucosa oxidasa (Quimefa®, Cuba).

2.8 Análisis de los datos

Todos los datos se procesaron y se evaluaron por medio de un análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias se detectaron mediante Student-Newman-Keuls test post-hoc.

3. Resultados:

La adición de glucosa al agua de estanque donde se encontraban las tilapias (*O. niloticus*) indujo hiperglucemia en ellas. En el estanque que contenía 25 g / L de

glucosa disueltos el agua aumentó la concentración del monosacárido en la sangre de los animales en un 27% en comparación con el grupo control. La glucemia de las tilapias mostró saturación cuando se añadieron más de 50 g de glucosa por litro de agua. Un aumento medio del 50% en la concentración de glucosa en sangre, en comparación con el grupo de control, se observó cuando se añadió al estanque entre 50 y 100 g / L de glucosa (Figura 1).

Incluso después de 90 minutos de la inducción de la hiperglucemia en *O. niloticus*, los niveles de glucosa en suero eran mayores que en el grupo control. El valor elevado de glucosa en sangre ($6,76 \pm 0,49$ mmol/L) se obtuvo a los 15 minutos después del comienzo del período de inducción. El nivel de glucosa en sangre se mantuvo alto durante 60 minutos después de la incubación de los peces en el medio enriquecido con el monosacárido, aunque la glucemia disminuyó a $4,48 \pm 0,24$ mmol/L, aún era significativamente mayor que el grupo control ($3,18 \pm 0,29$ mmol/L). Dos horas después de la inducción de la hiperglucemia, la glucosa sérica se redujo a valores similares a los del grupo de control (Figura2). La administración del extracto acuoso de hojas de *O. tenuiflorum* mostró una reducción significativa de los niveles séricos de glucosa en los animales hiperglucémicos. Los valores de glucosa en suero de tilapia tratadas con el extracto vegetal ($3,26 \pm 0,62$ mmol / L) fueron similares a los del grupo de control ($3,54 \pm 0,55$ mmol / L). La glucosa en el suero de los animales inyectados con la insulina humana también se redujo a valores similares al grupo de control ($3,11 \pm 0,58$ mmol/L). El grupo hiperglucémico que no recibió tratamiento adicional tenían niveles séricos de sangre significativamente superior a los del grupo control ($5,39 \pm 1,18$ mmol/L).

Los resultados mostraron que los extractos de hojas de *O. tenuiflorum* poseen un potencial significativo hipoglucemiante en el modelo de tilapia hiperglucémica y fue dependiente de la dosis. Los valores de glucosa en suero de tilapia tratadas con 200 mg/L ($3,25 \pm 0,57$ mmol / L) y 400 mg / L ($3,33 \pm 0,55$ mmol / L) de extracto de la planta fueron similares a los del grupo de control ($3,09 \pm 0,82$ mmol / L). Sin embargo, el grupo hiperglucémico que recibió 80 mg / L de tratamiento tenía niveles séricos de sangre significativamente mayores a los del grupo control

(4,51 ± 0,34 mmol / L), pero menor que el grupo de hiperglucemia que no recibió tratamiento adicional (6,33 ± 0,71 mmol / L). La dosis de 40 mg / L de extracto de *O. tenuiflorum* no disminuyó los niveles de glucosa de la sangre en los animales con hiperglucemia inducida (6,26 ± 0,68 mmol / L).

4. Discusión:

Aunque los hipoglucemiantes orales y la insulina a menudo tienen éxito en el tratamiento de la diabetes, estos producen efectos secundarios importantes y no alteran significativamente el curso de las complicaciones diabéticas (6). Las hierbas medicinales se espera que tengan un grado de eficacia similar sin los efectos secundarios indeseables asociados al tratamiento farmacológico convencional (7). Idealmente, se deben realizar ensayos preclínicos *in vivo* antes de usar tratamientos con hierbas medicinales (4).

Existen varios modelos animales para estudiar la diabetes. La mayoría utilizan primates, mamíferos pequeños, ratones o ratas, en el que la diabetes se induce químicamente a través de la inyección de estreptozotocina o alloxan. Los productos químicos utilizados para inducir la diabetes dependiente de la insulina tienen efectos secundarios indeseables en riñón, pulmón e hígado. Se producen tumores de hígado (estreptozotocina) y necrosis renal (aloxano), que ilustra la falta de especificidad de estos fármacos lo que puede afectar los niveles de glucosa en sangre (8).

En el presente trabajo, la hiperglucemia se indujo en tilapias mediante la adición de glucosa al agua del estanque de los peces. Esto está de acuerdo con la inducción de la hiperglucemia en pez cebra adulto que se ha propuesto como un modelo para estudiar la retinopatía diabética (9). Estos autores encontraron que el pez cebra incubado en soluciones de glucosa por encima de 50 g / L sufrían daños o incluso muerte en el transcurso de cuatro horas. Para inducir la hiperglucemia en las tilapias se incubaron los peces por sólo 30 minutos y no hubo fallecimiento de los peces.

Las larvas del pez cebra puede ser un modelo adecuado para el examen de metabolismo de la glucosa, si se utiliza la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa como un indicador de los niveles de glucosa en sangre (6). Debido a que es más grande, la tilapia, tiene una ventaja sobre el pez cebra para el estudio de los niveles de glucosa y órganos. Los datos presentados en este trabajo indican que este animal es un modelo adecuado para probar las hierbas medicinales que tienen actividad hipoglucemiante. La decisión de cuál es el modelo de la diabetes que se utilizará para un protocolo en particular está influenciada principalmente por los recursos locales (5).

La disminución de la glucosa en suero observada después de la administración de la insulina humana en tilapia (*O. niloticus*), está de acuerdo con la homología estructural entre las insulinas humana y de peces. La insulina de peces se ha demostrado ser funcional en ratones y seres humanos (10). Sin embargo, la tilapia transgénica que expresa "insulina de tilapia humanizada" ha sido examinada como una manera de evitar la producción de anticuerpos anti-insulina(11).

En el presente estudio, el extracto acuoso de hojas de *O. tenuiflorum* produjo un descenso significativo de los niveles de glucosa en sangre de tilapias hiperglucémicas. Diferentes extractos de plantas de la familia *Lamiaceae* (Labiatae) también han demostrado tener actividad hipoglucemiante. La inyección intraperitoneal, en ratas normales y diabéticas, de extracto un metanólico de *Ocimum gratissimum* deja significativamente reducido el nivel de glucosa en plasma en un 56% y 68%, respectivamente (12). El extracto etanólico de hojas de *Ocimum sanctum* mostró efecto hipoglucemiante en conejos albinos (26%) en condiciones normales (2). La administración de extracto acuoso de *Ocimum canum* disminuyó los niveles de glucosa en sangre en ratones C57BL/KsJ diabéticos y no diabéticos-(13, 14).

En este trabajo, se observó que los extractos de hojas de *O. tenuiflorum* poseen una significativa actividad hipoglucemiante dosis-dependiente en tilapias hiperglucémicas. El hecho de que no se observó toxicidad ni letalidad en ninguna de las dosis del extracto de *O. tenuiflorum* explica el amplio margen de seguridad de los extractos dentro del rango de dosis. Esto se corresponde con lo observado al utilizar los extractos acuosos de las hojas de *Ocimum sanctum* y *Ocimum lamiifolium* que mostraron actividades antipiréticas en ratones (15).

Este es el primer informe que demuestra la actividad de disminución de glucosa en suero del extracto acuoso de la hoja de *O. tenuiflorum* en peces hiperglucémicos.

Son necesarios estudios adicionales para revelar el mecanismo de acción de este extracto en la disminución del nivel de glucosa en sangre. El nuevo modelo de tilapia que proponemos puede ayudar a acelerar estos estudios y extractos de plantas de prueba.

6. Referencias Bibliográficas:

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;**21**(9):1414–31.
2. Yajnik CS. The insulin resistance epidemic in India: fetal origins, later lifestyle, or both? *Nutr Rev* 2001;**59**(1):1–9.
3. Vats V, Yadav SP, Grover JK. Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J Ethnopharmacol* 2004;**90**:155–60.
4. WHO Expert Committee. Diabetes mellitus. 2nd rep. Gen, World Health Organisation. Technical Report Series 646; 1980.
5. Fröde FTS, Medeiros YS. Animal models to test drugs with potential anti-diabetic activity. *J Ethnopharmacol* 2008;**15**:173–83.
6. Elo B, Villano CM, Govorko D, White LA. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *J Mol Endocrinol* 2007;**38**:433–40.

7. Canoa JH, Volpato G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J Ethnopharmacol* 2004;**90**:293–316.
8. Patil R, Patil R, Ahirwar B, Ahiwar D. Isolation and characterization of anti-diabetic component (bioactivity-guided fractionation) from *Ocimum sanctum* L. (Lamiaceae) aerial part. *Asian Pac J Trop Med* 2011; :278-282.
9. Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. *J Ethnopharmacol* 2002;**81**:81–100.
10. Kim SH, Hyun SH, Choung SY. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol* 2006;**104**:119–23.
11. Chavin W, Young J. Effects of alloxan upon goldfish (*Carassius auratus* L.). *Gen Comp Endocrinol* 1970;**14**:436–60.
12. Gleeson M, Connaughton V, Arneson LS. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol* 2007;**44**:157–63.
13. Mommsen TP, Plisetskaya EM. Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Rev Aquat Sci* 1991;**4**:225–59
14. Wright JR Jr, Pohajdak B. Cell therapy for diabetes using piscine islet tissue. *Cell Transplant* 2001;**10**:125–43.
15. Pohajdak B, Mansour M, Hrytsenko O, Conlon JM, Dymond LC, Wright JR Jr. Production of transgenic Tilapia with Brockmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transgenic Res* 2004;**13**:313–23.
16. Aguiyi JC, Obi CI, Gang SS, Igweh A. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. *Fitoterapia* 2000;**71**:444–46.
17. Nyarko AK, Asare-Anane Ofosuhene M, Addy ME. Extract of *Ocimum canum* lowers blood glucose and facilitates insulin release by isolated pancreatic β -islet cells. *Phytomedicine* 2002;**9**:346–51.
18. Nyarko AK, Asare-Anane H, Ofosuhene M, Addy ME, Teye K, Addo P. Aqueous extract of *Ocimum canum* decreases levels of fasting blood glucose and free radicals and increases antiatherogenic lipid levels in mice. *Vasc Pharmacol* 2003;**39**:273–79.

Makonnen E, Debella A, Zerihun L, Abebe D, Teka F. Antipyretic properties of the aqueous and ethanol extracts of the leaves of *Ocimum suave* and *Ocimum lamiifolium* in mice. *J Ethnopharmacol* 2003;**88**:85–91.

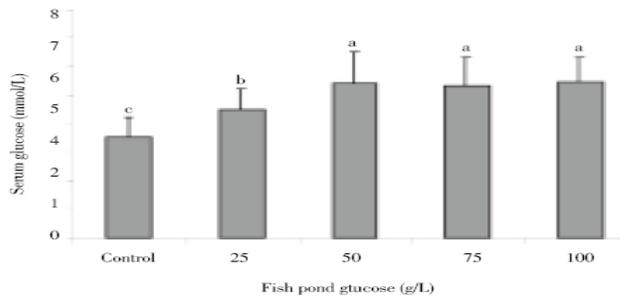


Figura 1: Inducción de hiperglucemia en tilapia (*O. niloticus*) después de la adición de glucosa al agua del estanque de las tilapias. El monosacárido se añadió a las concentraciones 0, 25, 50, 75 and 100 g/L, respectivamente. Después de 30 minutos los peces se transfirieron a agua limpia y se tomaron muestras de sangre. Las letras indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$). Las barras T indican el SEM a cada punto ($n=7$).

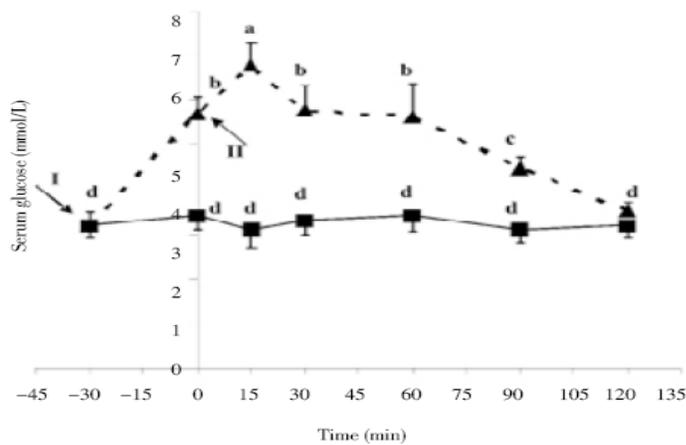


Figura 2: Variación de los niveles de glucosa en el suero de tilapias (*O. niloticus*) después de inducida la hiperglucemia. El monosacárido se añadió al estanque a 50 g/L en el grupo experimental: 30 min después se transfirieron los animales a agua limpia. Las muestras de sangre los minutos 0, 15, 30, 60, 90 después de la adición de glucosa para inducir hiperglucemia. El grupo control no recibió tratamiento. Las flechas indican el comienzo (I) y el final (II) del periodo de inducción. Las letras indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$). Las barras indica el SEM en cada punto ($n=5$).