



María Eliana Hidalgo L.<sup>a</sup>

María Isabel López<sup>a</sup>

Ernesto Fernández B.<sup>a</sup>

Enrique Cabrera<sup>a</sup>

Helmuth Goecke<sup>b</sup>

Jacqueline Ruz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Chile

<sup>b</sup> Knop Laboratorios, Quilpué, Chile

FIGURA 1. *Vitis vinifera*. Foto: B. Vanaclocha.

## Efecto antioxidante de un extracto de semilla de uva en pacientes diabéticos tipo 2

### Abstract

The oxidative stress is associated to diabetes mellitus and its evaluation can be indicative of the state of the pathology. In this study, the effect of a three months treatment with 100 mg/day of a grape seed dry extract (Uvanox®), in unbalanced diabetic patients, was investigated. The state of the enzymatic (erythrocytic catalase activity) and non-enzymatic (antioxidant status in plasma) antioxidant defences, as well as the lipoperoxidation level and the osmotic fragility of the red blood cell membrane were analysed. After the treatment, the results show a significant decrease of the membrane lipids damage, a non significant tendency to the decrease of the osmotic fragility, a significant increase of the total plasmatic antioxidant capacity and a decrease (not statistically significant) of the catalase activity. After the treatment with the grape seed dry extract all parameters showed changes indicative of an improvement of the antioxidative state of the patients.

### Key words

Oxidative stress, *Vitis vinifera*, grape seed dry extract, diabetes mellitus.

### Resumen

El estrés oxidativo está asociado a diabetes mellitus y su evaluación puede ser indicativa del estado de dicha enfermedad. Se estudió el efecto de la administración de 100 mg/día de extracto seco de semilla de uva (Uvanox®), durante un periodo de tres meses, a pacientes diabéticos descompensados. Se analizó el estado de las defensas antioxidantes enzimáticas (actividad catalasa eritrocitaria) y no enzimáticas (actividad antioxidante en plasma), nivel de lipoperoxidación y fragilidad osmótica de la membrana eritrocitaria. Tras el tratamiento, los resultados muestran una disminución significativa del daño a lípidos de membrana, una tendencia a la disminución de la fragilidad osmótica, aunque no significativa, un incremento significativo de la capacidad antioxidante total y una disminución (no estadísticamente significativa) de la actividad catalasa. En todos los parámetros, después de administrar extracto seco de semilla de uva, se producen cambios indicativos de una mejora del estado oxidativo de los pacientes.

### Palabras clave

Estrés oxidativo, extracto seco de semilla de uva, *Vitis vinifera*, diabetes mellitus.



## Introducción

El estrés oxidativo se ha definido como una ruptura, en la materia viva, del equilibrio que debe existir entre los compuestos prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado <sup>(1)</sup>.

Para evitar este daño, el organismo dispone de un sistema de defensa antioxidante que está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Dentro de este grupo se encuentran las enzimas celulares superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Esta enzima tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos). Presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno <sup>(2)</sup>.

Entre las defensas no enzimáticas se encuentra la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, un antioxidante efectivo que se encuentra en las membranas biológicas, donde su protección es particularmente importante. También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical HO<sup>\*</sup> y al anión superóxido <sup>(3)</sup>.

El sistema antioxidante puede ser reforzado o debilitado por factores externos, tales como la dieta, ejercicio, tabaquismo, consumo de vitaminas, etc. Asimismo, el consumo de antioxidantes naturales o sintéticos puede reforzar los mecanismos antioxidantes del organismo.

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos, presentes en la naturaleza y también en la dieta, cuya estructura química los hace ser potentes antioxidantes. Entre los polifenoles, se encuentran los flavonoides y las proantocianidinas, muchos de los cuales tienen una capacidad antioxidante mayor que las vitaminas A y E. Se encuentran en bebidas como el té y el vino <sup>(4)</sup>. También, particularmente las

proantocianidinas, se extraen de la semilla de uva (*Vitis vinifera* L.).

El extracto seco de semilla de uva contiene compuestos polifenólicos (catequinas, proantocianidinas), con actividad antioxidante. Estos compuestos han demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, ser más eficaces como captadores de radicales libres que las vitaminas C y E aisladas o en conjunto. Dentro de todas las propiedades que posee, se ha demostrado para el extracto seco de semilla de uva efectos cardioprotectores *in vitro* (por ejemplo, inhibición de la adhesión de monocitos, protección frente a la LDL oxidada, inhibición de la activación de plaquetas) <sup>(5-7)</sup>, acción antiinflamatoria, anti-artrítica, anti-alérgica, captadora de radicales e inhibidora de la actividad oxidativa inducida por la radiación ultravioleta (UV). La presencia de resveratrol, puede proveerle de actividad antiestrogénica, con inhibición del crecimiento de células neoplásicas de cáncer mama, lo que junto a otras acciones, constituyen elementos preventivos contra agentes carcinogénicos <sup>(8)</sup>.

Se ha demostrado en varios estudios que en pacientes con diabetes mellitus, se producen cambios en indicadores bioquímicos que evidencian una situación de estrés oxidativo y que esta situación de desequilibrio comienza en una etapa temprana de la enfermedad: disminuyen las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E, se incrementa la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), se incrementa la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación, se reduce la capacidad antioxidante total del plasma y se daña el material genético <sup>(9-11)</sup>.

Esto se debe a que la glucosa se oxida y da lugar a la formación de alfacetoaldehídos, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>), entre otras ERO <sup>(12-13)</sup>. También se plantea que el descontrol de la glicemia conduce al incremento de la velocidad de los procesos de glicosilación y oxidación de lípidos y proteínas de membrana, lo que provoca cambios conformacionales de estas macromoléculas y por lo tanto el deterioro de sus funciones <sup>(9; 14, 15)</sup>.

El glóbulo rojo constituye un buen modelo para el estudio del efecto de los procesos lipoperoxidativos en la estructura y función celular, ya que en el eritrocito se forman normalmente radicales superóxido e hidroxilo como producto de la autooxidación de



la hemoglobina. Esto significa que, a través de su función, el eritrocito se hace susceptible a sufrir daño lipoperoxidativo que es aminorado, aunque no eliminado, por la actividad de sus sistemas enzimáticos protectores. La acumulación de este daño oxidativo podría regular la vida media del eritrocito en el torrente sanguíneo y podría aumentar el envejecimiento del glóbulo rojo, para su posterior retiro de circulación <sup>(16)</sup>.

Uvanox<sup>®</sup> es un preparado cuyo principio activo es un extracto seco de semilla de uva. Dado que dicho extracto tiene propiedades antioxidantes, debido a su contenido de compuestos polifenólicos (especialmente catequinas y proantocianidinas), y que se ha demostrado que en la diabetes mellitus se originan radicales libres, se postula que en pacientes diabéticos descompensados, la administración del preparado Uvanox<sup>®</sup> llevaría a una normalización de los parámetros indicativos de estrés oxidativo.

## Materiales y métodos

### Donantes

Los donantes (13 mujeres y 10 hombres, de entre 40 y 80 años de edad) que presentan diabetes mellitus tipo 2 o diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID) (2 de los cuales requieren actualmente administración de insulina), fueron seleccionados entre pacientes diabéticos descompensados (hemoglobina glicosilada mayor a 7,5 %) provenientes del Consultorio de Quebrada Verde de Playa Ancha (Chile), siendo éste el único requisito para su selección. La hemoglobina glicosilada cuantificada es la A1c, a través del método de HPLC, midiéndose una vez al año en el consultorio.

Antes de la toma de muestra de sangre (en ayunas), se les explicó en que consistía el estudio, el tiempo de duración y la forma indicada de la administración del preparado, con el fin de obtener su consentimiento informado y voluntario, además se les aplicó una encuesta nutricional, fármaco-terapéutica y de historia clínica. Posteriormente se les administró Uvanox<sup>®</sup>.

### Tratamiento

Uvanox<sup>®</sup> es un preparado que contiene 50 mg de extracto seco de extracto seco de semilla de uva (*Vitis vinifera*). Dicho extracto está estandarizado para un contenido 8 mg catequinas totales por comprimido. Uvanox<sup>®</sup> es un preparado registrado como medicamento fitoterápico en Chile y Perú.

Se administraron dos comprimidos al día (el primero en la mañana después del desayuno y el segundo alrededor de las 18 horas), por un periodo de tres meses.

Fueron contactados telefónicamente una vez por semana, para controlar la adherencia al tratamiento. El tiempo transcurrido entre el final del tratamiento y la segunda toma de sangre fue entre 2 a 7 días.

### Preparación de la muestra

10 mL de sangre venosa heparinizada, se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos. Se separa el plasma, se descarta la capa leucocitaria y los eritrocitos se lavan tres veces con buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4). Para el análisis enzimático, se prepara un hemolizado de cada muestra con una solución hipotónica en una proporción 1:28. Todos los ensayos se realizaron con muestras frescas preparadas y analizadas de inmediato una vez obtenidas. El mismo procedimiento se realizó tras los tres meses de duración del tratamiento. El plasma se guarda alícuotado, rotulado y congelado a  $-15^{\circ}$  C hasta su uso para las determinaciones.

### Determinación de la actividad catalasa

La cinética se sigue espectrofotométricamente por lecturas de absorbancia a la longitud de onda de 240 nm, los resultados se normalizan de acuerdo a la cantidad de hemoglobina de cada muestra <sup>(17)</sup>.

### Determinación de la cantidad de hemoglobina

Las concentraciones de hemoglobina (oxihemoglobina, metahemoglobina y hemicromo) en hemolizados, se calculan a partir del análisis del espectro de absorción de la hemoglobina en el rango de 500 a 700 nm, usando las ecuaciones descritas por Winterbourn <sup>(18)</sup> y expresados en concentración  $\mu$ M.

### Determinación de la capacidad antioxidante total en plasma (TRAP)

Consiste en la determinación de defensas antioxidantes no enzimáticas, las que son detectadas al producir radicales libres *in vitro* (radical catiónico ABTS). La cinética de formación se siguió espectrofotométricamente a 734 nm <sup>(19)</sup>.

### Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Una vez separadas las proteínas de la muestra, por precipitación con ácido tricloroacético (30 % P/V), se hace reaccionar con ácido tiobarbitúrico (0,67 %), calentando en baño María hirviendo. A partir

del espectro de absorción entre 450 y 600 nm, se determina la absorbancia a 535 nm. Los datos se expresan como nanomoles/mL de malondialdehído (MDA) desde una curva de calibración.

### Determinación de la fragilidad osmótica

Se prepara una suspensión de eritrocitos al 20% y se le agregan diferentes concentraciones (rango 0,15% a 0,9%) de NaCl en tampón pH 7,4, se homogenizan y se dejan reposar por una hora a temperatura ambiente, se centrifugan a 3.000 rpm por 10 minutos. Se mide la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm, utilizando agua como blanco. Se determina la concentración de NaCl que da lugar al 50 % de hemólisis <sup>(20)</sup>.

### Metodología estadística

Se empleó un test no paramétrico para datos pareados, el test de Wilcoxon, donde  $p < 0,05$  expresa diferencias significativas; y el t-test para datos pareados ( $p < 0,05$  expresa diferencias significativas).

## Resultados

### 1. Actividad Enzimática de Catalasa (CAT)

Aún cuando no se encontraron diferencias significativas entre la medición antes y después del tratamiento (T-test,  $p = 0,38396$ ; Wilcoxon  $p = 0,41154$ ), la FIGURA 2 muestra una clara tendencia a la disminución de la actividad enzimática.

### 2. Capacidad antioxidante total en plasma sanguíneo (TRAP)

Los resultados (FIGURA 3) indican que existen diferencias significativas entre la medición antes y después del tratamiento con Uvanox® (T-test  $p = 0,04376$ ; Wilcoxon  $p = 0,05971$ ). Además se aprecia que un 65,2% de los pacientes experimentó un aumento de esta capacidad, y en un 4,35%, que corresponde a uno de los pacientes diabéticos que actualmente requieren administración de insulina, esta capacidad permanece inalterada.

### 3. Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este análisis mostró (FIGURA 4) que existen diferencias significativas (T-test  $p = 0,009448$ ; Wilcoxon  $p = 0,022548$ ), entre la medición antes y después del tratamiento con Uvanox, encontrándose que en un 82,61% de los pacientes tratados, se produjo una disminución de este parámetro y, por tanto, del posible daño a lípidos de membrana, lo cual se re-

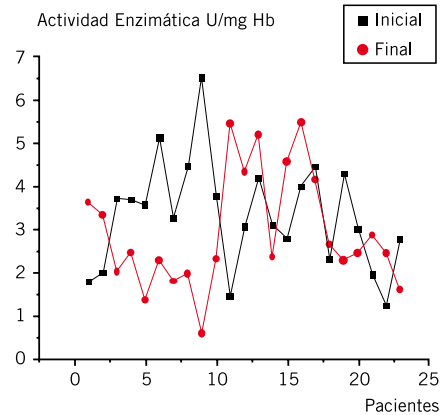


FIGURA 2. Efecto del extracto seco de semilla de uva sobre la actividad catalasa (U/mg Hb) determinada en hemolizado de eritrocitos antes (inicial) y después (final) del tratamiento.

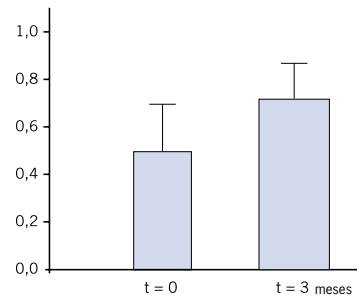


FIGURA 3. Efecto del extracto seco de semilla de uva sobre la capacidad antioxidante total ( $\mu\text{M}$ ), determinada en plasma, antes (inicial) y después (final) del tratamiento.

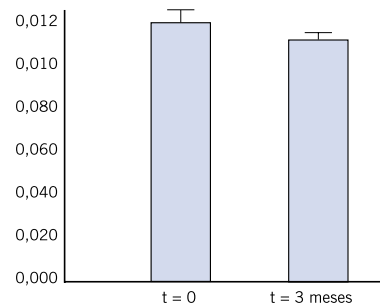


FIGURA 4. Efecto del extracto seco de semilla de uva sobre las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol MDA), determinada en eritrocitos, antes (inicial t = 0) y después (final t = 3 meses) del tratamiento.

laciona directamente con una disminución también del estrés oxidativo sistémico.

#### 4. Determinación de fragilidad osmótica

Este último análisis mostró (FIGURA 5) que no existen diferencias significativas, entre la medición antes y después del tratamiento con Uvanox® (T-test  $p = 0,22397$ ; Wilcoxon  $p = 0,075204$ ) aunque esta disminución se ve en un 69,56% de los pacientes tratados, concordante con el hecho que si existe menos fragilidad de los eritrocitos, debido a que sus membranas han sufrido menos daño, involucra un mejoramiento del estado oxidativo de los pacientes.

#### Discusión

En la presente investigación, la realización de una encuesta nos permitió conocer el estado nutricional y patológico de los pacientes antes que comenzaran con el tratamiento antioxidante, ya que la dieta es un componente vital del programa para el control de la diabetes y existe además una relación entre la dieta y el estrés oxidativo. Por otra parte, en este grupo de pacientes ninguno era fumador, lo que podría influir en el estado oxidativo, y su ingesta de alcohol es reducida, consumiendo solo vino tinto en pequeñas cantidades.

En lo que respecta a la dieta, como norma general, un paciente que padece DMNID debe adherirse a un plan alimentario que lo ayude a mantener un peso correcto y un equilibrio entre los alimentos y la insulina que su cuerpo es capaz de producir <sup>(21)</sup>.

La información obtenida de la encuesta confirma que el grupo en estudio, consume una dieta con un gran aporte en carbohidratos, incluyendo alimentos que están prohibidos para este tipo de pacientes (helados y dulces, en un 78% del grupo en estudio); también llama la atención el alto consumo de grasas saturadas (sobre el 50%), no recomendadas por incrementar los factores de riesgo tales como el aumento del colesterol.

Esta información confirma que el grupo en estudio, además de ser diabéticos sin control metabólico, ingiere una alimentación que contribuye aún más al desarrollo de la patología, aunque no se observan alteraciones asociadas.

Por otra parte, un alto porcentaje de los pacientes (sobre el 60%) incluye en su dieta alimentos que contienen gran cantidad de antioxidantes (frutas y verduras), lo que podría influir en la disminución del

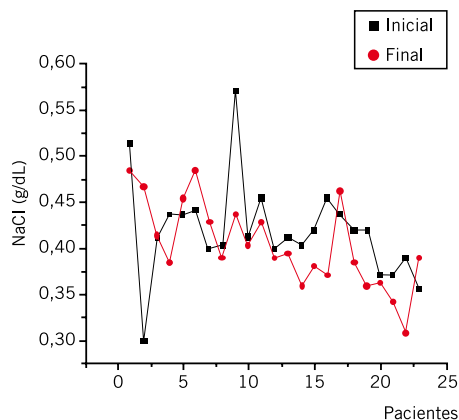


FIGURA 5. Efecto del extracto seco de semilla de uva sobre la fragilidad osmótica determinada en suspensiones de eritrocitos al 20%, a  $t = 0$  horas, antes (inicial) y después (final) del tratamiento.

grado de estrés oxidativo causado por la patología. A pesar de ello, puede ser de utilidad la administración de un antioxidante que refuerce las defensas del organismo y que tienda a mejorar el estado de estrés oxidativo asociado.

La disminución de la actividad de la enzima de defensa catalasa, se produjo en un 56,5% de los pacientes tratados con el antioxidante Uvanox, que actuaría inhibiendo la oxidación de la glucosa, lo que implicaría una mejora en el grado de estrés oxidativo después del tratamiento, existiría una relación proporcional entre éste y la actividad enzimática, ya que se ha encontrado que la actividad de la catalasa en eritrocitos está aumentada en pacientes diabéticos, comparados con pacientes controles no diabéticos <sup>(22)</sup>.

Cabe señalar que en los de pacientes antes mencionados, que actualmente requieren la administración de insulina, esta actividad aumentó, mostrando, por tanto, un comportamiento distinto al resto de los pacientes, e indicando ausencia de mejora en el grado de estrés oxidativo para este tipo de pacientes. Esto podría explicarse por un aumento de la glucosa y su consiguiente oxidación, de forma que los productos finales de glicosilación avanzada (AGE), que se forman de modo irreversible formarían enlaces covalentes con otras proteínas, potenciando así el daño y explicando la ineficiencia del tratamiento <sup>(23)</sup>. Una conclusión definitiva al res-