

Efectos del extracto de semillas de uva sobre la cistopatía diabética inducida por estreptozotocina en ratas

María Lourdes Arruzazabala, Yazmín Ravelo, Daisy Carbajal, Vivian Molina y Rosa Mas.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 21 y 19, Reparto Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: lourdes.arruzazabala@cnic.edu.cu

Recibido: 27 de enero de 2009.

Aceptado: 26 de marzo de 2009.

Palabras clave: extracto de semillas de uvas, neuropatía, cistopatía, diabetes, estreptozotocina.
Key words: grape seed extract, neuropathy, cystopathy, diabetes, streptozotocin.

RESUMEN. La diabetes por estreptozotocina (STZ) en ratas se produce como consecuencia de la necrosis subtotal de los islotes pancreáticos y provoca hiperglicemia, hipoinsulinemia, disminución de la ganancia en peso y aumento del peso de la vejiga, así como hipercontractilidad al carbachol por sobreexpresión de los ARNm-receptores muscarínicos M_2 y M_3 del detrusor y el urotelio. El extracto de semillas de uva (ESU), rico en flavonoides, ha mostrado efectos antioxidantes y neuroprotectores en modelos experimentales. Por tanto, este estudio investigó si el tratamiento con ESU atenuaba la cistopatía inducida por STZ en ratas. Los animales se distribuyeron en tres grupos: un grupo control no diabético y dos grupos tratados con STZ (50 mg/kg, intraperitoneal). Cuatro semanas después, tanto el grupo control negativo como uno de los tratados con STZ (control positivo) recibió el vehículo por vía oral (p.o.), mientras el tercer grupo recibió ESU (200 mg/(kg · d), p.o.) durante cuatro semanas. Al concluir este período se cuantificó el peso corporal y las concentraciones séricas de glucosa y creatinina. La actividad funcional de la vejiga se investigó usando carbachol (10^{-7} - 10^{-5} mol/L) y KCl (100 mmol/L) para inducir las contracciones en cada preparación aislada. Las ratas diabéticas por STZ mostraron disminución de la ganancia en peso corporal y aumento de las concentraciones de glucosa y creatinina, así como del peso de las vejigas con relación al grupo control negativo. Las contracciones máximas (E_{max}) inducidas por el carbachol en vejigas aisladas fueron significativamente mayores (hiperreactividad) en las ratas diabéticas que en los controles negativos. El tratamiento con ESU [200 mg/(kg · d)] no modificó la reducción del aumento de peso corporal ni la hiperglicemia en ratas con diabetes inducida por STZ. Además, el ESU no afectó la hiperreactividad al carbachol (E_{max}) ni la respuesta contráctil del KCl 100 mmol/L de las preparaciones aisladas de vejiga de rata, pero impidió completamente el aumento de las concentraciones séricas de creatinina inducido por STZ.

ABSTRACT. Streptozotocin (STZ)-induced diabetes in rats results from a subtotal necrosis of the pancreatic islets, producing hyperglycemia, hypoinsulinemia, reduction of bodyweight gain and increase of bladder weight, accompanied by the hypercontractility to carbachol due to the over-expression of the M_2 and M_3 mRNAs-muscarinic receptors of the detrusor muscle and urothelium. Grape seed extract (GSE), rich in flavonoids, exerts antioxidant and neuroprotective effects on experimental models. Hence, this study researched whether the treatment with GSE ameliorates the STZ-induced cystopathy in rats. Animals were distributed into three groups: a non-diabetic negative control group and two others treated with STZ (50 mg/kg, intraperitoneal). Four weeks later, both the negative control and one of the STZ-treated groups (positive control) received orally (p.o.) the vehicle, while the third one received GSE [200 mg/(kg · d), p.o.] during four weeks. At the end of this period body weight, serum levels of glucose and creatinine were determined. Bladder functional activity was researched using carbachol (10^{-7} a 10^{-5} mol/L) and KCl (100 mmol/L) for inducing the contractions on the isolated preparations. STZ-diabetic rats showed reduced bodyweight gain, increased serum glucose and creatinine values, as well as increased bladder weight compared with the negative control group. Maximal contractions induced by carbachol (E_{max}) in bladders were significantly higher (hyperreactivity) in diabetic rats than in the negative controls. Treatment with GSE [200 mg/(kg · d)] did not modify the reduction of bodyweight gain and the hyperglycemia of rats with STZ-induced diabetes. Likewise, GSE unaffected neither the hyperreactivity to carbachol nor the contractile response to KCl 100 mmol/L of rat bladder isolated preparations, but totally avoided the increase of serum creatinine levels induced by STZ.

INTRODUCCIÓN

Ha sido descrito que entre un 26 y un 78 % de los pacientes con diabetes mellitus (DM) presentan disfunción del tracto urinario bajo y que la cistopatía diabética es una complicación común de la DM que ocurre a conse-

cuencia de la neuropatía diabética, una de las principales complicaciones de la enfermedad.¹⁻³

La diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratas es un modelo experimental de diabetes tipo I que se produce como consecuencia de la necrosis subtotal

de los islotes pancreáticos. Una producción de insulina residual hace posible que las ratas tratadas con STZ sobrevivan por un período relativamente extenso de tiempo, sin requerir suministro exógeno de insulina, pero desarrollando hiperglicemia, hipoinsulinemia y disminución de la ganancia en peso. Además, también ha sido reportado un aumento del peso de la vejiga y del volumen de orina residual en ratas tratadas con STZ, así como hipercontractilidad al carbacol asociada a la sobreexpresión de ARNm-receptores muscarínicos M_2 y M_3 en la vejiga⁴⁻⁹ sin modificar la afinidad de los receptores al carbacol (ED_{50}) ni la respuesta contráctil al KCl en preparaciones aisladas.⁹

Hasta el presente, la única droga reportada capaz de contrarrestar la cistopatía diabética inducida por STZ en ratas es el n-hexacosanol (alcohol ciclohexenónico) [3-(15-hidroxipentadecil)-2,4,4-trimetil-2-ciclohexénico 1], el cual sin modificar el estado diabético de las ratas tratadas con STZ, mejora la disfunción del detrusor de la vejiga de estos animales en forma dependiente de la dosis y revierte la sobreexpresión de mRNAs-receptores muscarínicos M_2 y M_3 localizados en el detrusor y el urotelio.⁹

Ha sido demostrado que los flavonoides, ampliamente distribuidos en las plantas, producen efectos beneficiosos relacionados con sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.¹⁰⁻¹⁷ El extracto de semillas de uvas (ESU) es rico en flavonoides (95 %),¹¹ y consecuentemente este extracto ha mostrado poseer efectos antioxidantes en modelos *in vitro* e *in vivo*.¹⁰⁻¹⁷ El ESU (100 mg/kg, por 30 d) ha mostrado también efectos neuroprotectores y antioxidantes *in vivo* en ratas adultas.¹²⁻¹⁷ En trabajos anteriores también ha sido reportado que el ESU (25 a 250 mg/kg) presenta efectos antioxidantes sobre indicadores de peroxidación lipídica en ratas¹⁸ y nefroprotección en un modelo de isquemia-reperfusión de la arteria renal en ratas.¹⁹

Teniendo en cuenta que en los trabajos anteriormente citados se ha reportado que el ESU (25 a 250 mg/kg) presenta efecto neuroprotector y antioxidante en diversos modelos experimentales, el objetivo de este estudio ha sido observar si la inducción de diabetes por STZ es capaz de provocar una cistopatía diabética evaluada como una hiperrespuesta al carbacol en ratas y si el tratamiento con ESU es capaz de revertir este efecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas Sprague Dawley machos, entre 220 y 250 g de peso y ocho semanas de edad, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), las que fueron previamente adaptadas durante siete días a las condiciones de laboratorio, a temperatura y humedad controladas [25 ± 2 °C, humedad 65 a 70 %, ciclos de luz-oscuridad de 12 h].

Sustancias

El ESU (Blackmores LTD, Australia) fue fundido en baño de arena a 60 °C y suspendido en goma acacia (10 mg/mL). La homogeneidad de la mezcla fue chequeada mediante inspección visual.

La STZ (Fluka Biochemika, China) se disolvió en disolución reguladora de citrato-fosfato 0,1 mol/L

Ejecución experimental

Se procedió según describe Saito.⁹ Ratas Sprague Dawley machos de ocho semanas de nacidas fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos: un control

no diabético y dos tratados con STZ (50 mg/kg, i.p.). La inducción de la diabetes fue corroborada midiendo la glucosa en orina dos días después del tratamiento con STZ. Cuatro semanas después, tanto el grupo control negativo como uno de los tratados con STZ (control positivo) recibió el vehículo por vía oral (p.o.), mientras el tercer grupo recibió ESU [200 mg/(kg · d), p.o.] durante cuatro semanas, ya que esta dosis ha resultado 100 % efectiva en diversos modelos experimentales.^{18,19}

El peso corporal fue registrado al inicio del experimento, a las cuatro semanas de haber inyectado la STZ y al concluir las cuatro semanas de tratamiento. Al concluir esta etapa, las ratas se sacrificaron por sobredosis de tiopental (60 mg/kg). Se realizó la apertura de su abdomen y se les extrajo sangre de la vena cava para la determinación de glucosa y creatinina. Inmediatamente se extrajo la vejiga, la cual se pesó y se introdujo en disolución Krebs para los estudios de contractilidad del órgano aislado.

Contractilidad de la vejiga. Las vejigas fueron disecadas para liberar todo el tejido exterior, se pesaron y se cortaron en espiral. Se ataron por sus extremos y se suspendieron en un baño de órganos que contenía disolución de Krebs burbujeada con una mezcla de gases (95 % O_2 y 5 % CO_2) a 37 °C.

Tras un período de incubación de 30 min, las contracciones fueron inducidas por la adición de concentraciones acumulativas crecientes de carbacol (BDH Chemicals Ltd, Inglaterra) (10^{-7} ó 10^{-5} mol/L) al baño de órganos. Las preparaciones fueron lavadas hasta obtener el tono basal de la preparación y se añadió KCl (100 mmol/L). Las contracciones fueron registradas mediante un transductor fuerza-desplazamiento (modelo: TB-612T) conectado a un polígrafo Nihon-Kohden (Japón). Se construyeron las curvas concentración – respuesta, incluyendo respuestas máximas, y la respuesta contráctil se expresó en gramos de tensión.

Determinación de glucosa y creatinina. La sangre extraída se centrifugó a 2 500 r/min durante 10 min para la obtención del suero. Las determinaciones se realizaron mediante juegos de reactivos de diagnóstico (Cenis, Ciudad de La Habana, Cuba) y las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro, Ultrascopic 2000 (Pharmacia, Biotech) a 510 nm.

Análisis estadístico. Para cada preparación aislada se obtuvo la concentración efectiva 50 (CE_{50}) y la contracción máxima alcanzada (efecto máximo, $E_{máx.}$) las cuales fueron tomadas como variables de comparación entre los grupos. Las comparaciones entre los grupos se realizaron utilizando la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney. La relación concentración-efecto se exploró mediante un análisis de regresión. Se utilizó el paquete de programas Statistics para Window (Release 4.2; StatSoft Inc, USA). Las CE_{50} fueron calculadas gráficamente utilizando el programa Microcal Origin Versión 5.00, Microcal Software, Inc., 1991-1997.

RESULTADOS

Características de los animales de experimentación

El tratamiento con STZ (50 mg/kg, i.p.) provocó una disminución en la ganancia en peso corporal a los 30 y 60 d de su administración con relación al grupo control negativo, así como un aumento del peso de la vejiga y de las concentraciones séricas de glucosa y creatinina (Tabla 1). El tratamiento con ESU (200 mg/kg) no modificó la reducción de la ganancia en peso, ni el aumento del peso de la vejiga ni la hiperglicemia provocada por la STZ, pero sí evitó completamente el aumento de las concentraciones séricas de creatinina producido por la STZ.

Respuesta contráctil al carbachol

El estado diabético de los animales inducido con STZ indujo una hiperrreactividad al carbachol de las vejigas aisladas que no se modificó por el tratamiento con ESU (200 mg/kg). Ninguno de los tratamientos (incluyendo la STZ) modificó la sensibilidad de las vejigas aisladas al carbachol cuantificado por las CE_{50} ni las respuestas contráctiles de ellas inducida por KCl (100 mmol/L). (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Los resultados reprodujeron los de Saito y cols.⁹ al confirmar que la inyección i.p. con STZ induce un estado diabético en las ratas que se caracteriza por la disminución de su ganancia en peso, el aumento de las concentraciones séricas de glucosa y creatinina y del peso de las vejigas y una hiperrreactividad de la vejiga aislada al carbachol. Saito y cols.⁹ plantean que el daño neural de las vejigas de las ratas diabéticas por STZ se asocia a un aumento de ARNm-receptores muscarínicos M_2 y M_3 , ya que la expresión de ellos es mayor en las ratas diabéticas que en los controles, indicando la posibilidad de que una sobreexpresión de estos receptores esté relacionada con la hipercontracción del detrusor de la vejiga al carbachol en las ratas diabéticas, en las cuales aumenta el número de estos receptores sin que se modifique su afinidad por los agonistas muscarínicos, ya que no varía la CE_{50} para el carbachol en este modelo.⁹

La única droga con efectos demostrados en este modelo, el n-hexacosanol, reduce significativamente la hiperrreactividad al carbachol del detrusor de la vejiga, disminuyendo la sobreexpresión de ARN m-receptores M_2 y M_3 , sin producir cambios en el estado diabético, siendo capaz también de evitar el aumento de las concentraciones séricas de creatinina inducido por la STZ.²⁰

Aunque diversos trabajos han demostrado que el ESU produce efectos antioxidantes y neuroprotectores, los resultados de este trabajo indican que la dosis administrada, la cual ha resultado máxima-efectiva en diferentes modelos de estrés oxidativo, no fue capaz de revertir la hiperrreactividad al carbachol concordando con el hecho de que hasta donde se conoce solo haya sido reportado efectivo en este modelo el n-hexacosanol y no existan

hasta el momento reportes de la eficacia de otras drogas como los antioxidantes, estatinas etc. en este modelo de daño neural.

La diabetes inducida por STZ provoca múltiples daños en las ratas, simultáneos al daño observado en vejiga urinaria, entre los que se encuentra el daño renal (nefropatía diabética) que implica alteraciones histopatológicas a nivel glomerular (túbulo intersticial) que inducen cambios en la filtración glomerular, los cuales se traducen en un aumento de las concentraciones de creatinina, malondialdehído, factor transformante de crecimiento beta 1 (TGF- β 1) y actividad de proteína quinasa C significativamente mayores que en los animales controles.²⁰⁻²² En este estudio se encontró que la STZ (50 mg/kg) aumentó las concentraciones séricas de creatinina, indicador de daño renal, aumento totalmente contrarrestado por el tratamiento con el ESU (200 mg/kg).

Ha sido demostrado que en la nefropatía inducida por STZ antioxidantes como la vitamina E (d-alfa-tocoferol) disminuyen las concentraciones de diacilglicerol (DAG) y previenen la activación de la proteína quinasa C que está asociada a la disfunción del riñón diabético.²¹ Ha sido demostrado también que el tratamiento con alfa-tocoferol previene o disminuye la hiperfiltración glomerular y el aumento de la albuminuria en las ratas diabéticas por STZ.²¹ Por tanto, el mecanismo del daño de la cistopatía (esencialmente neural) difiere del de la nefropatía, donde parecen estar involucrados otros factores patogénicos, por lo cual la acción antioxidante del ESU, al igual que ha sido referido para otros antioxidantes, podría explicar su efecto nefroprotector en este modelo.

CONCLUSIONES

Se ha reproducido un modelo experimental de inducción de diabetes por STZ en ratas provocando aumento de las concentraciones séricas de glucosa y creatinina, disminución de la ganancia en peso y aumento del peso de la vejiga urinaria, así como hipercontractilidad de las vejigas aisladas al carbachol. El ESU [200 mg/(kg · d)], p.o. administrado durante cuatro semanas no modificó el estado diabético de las ratas ni afectó la hiperrreactividad al carbachol ($E_{máx.}$) de las preparaciones aisladas

Tabla 1. Características generales de los animales de experimentación.

Tratamiento	Dosis de ESU (mg/kg)	Peso inicial (g)	Peso 30 d (g)	Peso 60 d (g)	Peso vejiga (g)	Concentración sérica glucosa (mmol/L)	Creatinina (μ mol/L)
C (-)	0	313,5 $\pm$ 7,8	418,6 $\pm$ 15,1	491,3 $\pm$ 18,8	0,13 $\pm$ 0,01	8,47 $\pm$ 0,64	57,8 $\pm$ 2,1
C (+) (STZ)	0	317,7 $\pm$ 7,6	319,2 $\pm$ 11,1***	331,0 $\pm$ 9,6***	0,249 $\pm$ 0,04**	30,04 $\pm$ 1,5**	74,01 $\pm$ 4,1**
STZ + ESU	200	304,1 $\pm$ 8,5	312,2 $\pm$ 9,3	323,2 $\pm$ 12,5	0,23 $\pm$ 0,01	31,30 $\pm$ 1,1	58,4 $\pm$ 2,6 ⁺

ESU Extracto de semilla de uva. **p < 0,01; ***p < 0,001. Comparación vs. control (-). +p < 0,05 Comparación vs. control (+), U de Mann Whitney.

Tabla 2. Efectos del ESU sobre las contracciones inducidas por carbachol en vejigas aisladas de ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ).

Tratamiento	Dosis de ESU (mg/kg)	$E_{máx.}$ carbachol (gramos de tensión)	CE_{50} ($\cdot 10^{-6}$ mol/L)	KCl (100 mmol/L) (gramos de tensión)
C (-)		3,67 $\pm$ 0,29	1,17 $\pm$ 0,06	2,20 $\pm$ 0,28
C (+) (STZ)		5,46 $\pm$ 0,36**	1,17 $\pm$ 0,05	2,18 $\pm$ 0,30
STZ + ESU	200	5,40 $\pm$ 0,59	1,27 $\pm$ 0,10	2,23 $\pm$ 0,27

**p < 0.01. Comparación vs. control (-). +p < 0.05 Comparación vs. control (+), U de Mann Whitney.

de vejiga urinaria de ratas, pero evitó completamente el aumento de las concentraciones séricas de creatinina inducido por STZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faerman I, Maler M and Jadzinsky M. Asymptomatic neurogenic bladder in juvenile diabetics. *Diabetología*. 1971;7:168-172.
2. Bradley WE. Diagnosis of urinary bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 92, 323-326, 1980.
3. Kaplan SA, Te AE and Blaivas JG. Urodynamic findings in patients with diabetic cystopathy. *J Urol*. 1995;153:342-344.
4. Sima AA and Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia*. 1999;42:773-88.
5. Latifpour J, Gousse A, Kondo S, *et al*. Effects of experimental diabetes on biochemical and functional characteristics of bladder muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;248:81-89.
6. Fukumoto Y, Yoshida M, Weiss RM and Latifpour J. Reversibility of diabetes-and diuresis-induced alterations in rat bladder dome muscarinic receptors. *Diabetes*. 1994;43:819-826
7. Watanabe T and Miyagawa I. Effects of long-chain fatty alcohol on peripheral nerve conduction and bladder function in diabetic rats. *Life Sci*. 2002 ;70:2215-2224.
8. Suzuki H, Saito Mand Kinoshita Y. Preventive effects of cyclohexenonic long-chain fatty alcohol on diabetic neuropathy in the rat bladder. *Can J Physiol. Pharmacol*. 2006;84:195-201.
9. Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, Shinbori C, Suzuki H, Yamada M *et al*. Ability of cyclohexenonic long chain fatty alcohol to reverse diabetes-induced cystopathy in the rat. *Eur Urol*. 2007;51:479-48.
10. Shi J, Yu J, Pohorly JE and Kakuda Y. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J Med Food*. 2003;6:291-299.
11. Rababah TM, Hettiarachchy NS and Horax R. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *J Agric Food Chem*. 2004;52:183-186.
12. Busserolles J, Gueux E, Balasinska B, Piriou Y, Rock E, Rayssiguier Y, *et al*. *In vivo* antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) bark in rats. *Int J Vitam Nutr Res*. 2006;76:22-27.
13. Balu M, Sangeetha P, Murali G and Panneerselvam C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23:501-507.
14. Balu M, Sangeetha P, Haripriya D and Panneerselvam C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. *Neurosci Lett*. 2005;383:295-300.
15. Devi A, Jolitha AB and Ishii N. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. *Med Sci Monit*. 2006;12:124-129.
16. Balu M Sangeetha P, Murali G and Panneerselvam C. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Res Bull*, 2006;68:469-473.
17. Feng Y, Liu YM, Fratkins JD and LeBlanc MH. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Bull*, 2005;66:120-127.
18. Pérez Y, Molina V, Mas R, González R M and Jiménez S. A comparison of *in vivo* effects of D-003, a mixture of high molecular weight sugarcane wax acids, and grape seed extract on lipid peroxidation markers in rats. *Lat Am J of Pharm*, 2008;27:498-504.
19. Carbajal, D Molina V, Noa M, Ravelo Y, Arruzazabala L, Más R, Valle M and Mendoza N. Protective effect of D-003 on renal ischemia-reperfusion in rats. *Lat Am J of Pharm*, 2009;28:5-9.
20. Saito M, Kinoshita Y, Shinbori C, Kono T, Hanada T, Uemasu J, *et al*. n-Hexacosanol ameliorates streptozotocin-induced diabetic rat nephropathy. *Eur J Pharmacol*. 2006;544:132-137.
21. Koya IK, Lee H, Ishii H, Kanoh H and King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Amer Soc Nephrol*. 1997;8:426-435.
22. Mooradian A and Haas M. Statins ameliorate glomerular permeability changes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Ther*. 2007;14:41-45.