

Efecto de las vitaminas antioxidantes C y E sobre la hipertrofia renal en ratas diabéticas

Segura Cobos David², Gatica Lara Karina¹, García Pineda Marcial¹, Guzmán Hernández Elizabeth Alejandrina^{2*}, Maritza Aurelia Omaña Molina¹, Vázquez Cruz Beatriz^{1†}

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Carrera de Biología, Barrios 1, Col. Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, C.P. 54090, México.

²Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Carrera de Médico Cirujano, Barrios 1, Col. Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, C.P. 54090, México.

*Autor para correspondencia: Dra. Elizabeth Alejandrina Guzmán Hernández; shponia2000@yahoo.com.mx

Recibido:

28/marzo/2020

Aceptado:

16/octubre/2020

Palabras clave:

Diabetes mellitus,
hipertrofia renal,
vitamina C,
vitamina E

Keywords

Diabetes mellitus,
kidney hypertrophy,
vitamin C,
vitamin E

RESUMEN

La estimulación de las enzimas antioxidantes en el riñón puede disminuir las complicaciones renales en la diabetes mellitus (DM). En este trabajo se estudió el efecto de las vitaminas C y E como antioxidantes en el daño renal producido por la DM. La DM se indujo con estreptozotocina 65 mg/kg, vía intraperitoneal. A las ratas DM se les administraron las vitaminas E y C en dosis de 250 y 500 mg/kg, vía oral, durante 2 semanas. Las vitaminas C y E restablecieron la función renal en ratas diabéticas: aumentaron la depuración de creatinina y disminuyeron la proteinuria; se observó una disminución del peso del riñón, del área celular tubular proximal y del coeficiente proteínas/DNA, aumentaron la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Así, las vitaminas E y C restauran las enzimas antioxidantes y retardan el desarrollo de la hipertrofia renal diabética.

ABSTRACT

Stimulation of antioxidant enzymes in the kidney can decrease kidney complications in diabetes mellitus (DM). This paper studied the effect of vitamins C and E as antioxidants on kidney damage caused by DM. DM was induced with streptozotocin 65 mg/kg, intraperitoneally. DM rats were given vitamins E and C in doses of 250 and 500 mg/kg orally for 2 weeks. Vitamins C and E restored renal function in diabetic rats: they increased creatinine purification and decreased proteinuria; a decrease in kidney weight, proximal tubular cell area and protein/DNA coefficient were observed, increased the activity of the enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. Thus, vitamins E and C restore antioxidant enzymes and slow the development of diabetic renal hypertrophy.



Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica degenerativa asociada a fallas en la acción o producción de la insulina que conlleva a alteraciones del metabolismo intermedio de carbohidratos, lípidos y proteínas. Específicamente la diabetes tipo 1 (DM1) se caracteriza, en general, por una reacción de tipo autoinmune que se manifiesta por una destrucción selectiva de las células beta del páncreas productoras de insulina, cuya ausencia en el organismo conduce a la hiperglucemia crónica (American Diabetes Association, 2020). Múltiples son los estudios que se realizan para desentrañar los mecanismos bioquímicos que permiten explicar la alta prevalencia de DM, y a pesar de que se ha demostrado la alta predisposición hereditaria a padecerla con la intervención de diversos factores ambientales, son varios los factores de riesgo que pueden asociarse.

El estrés oxidativo (EO) se considera uno de estos factores; se conoce que la alteración redox que conlleva al EO es propiciada por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas y los antioxidantes, donde la balanza se inclina a favor de los primeros (Maldonado et al., 2010). Este desbalance trae consigo daño a nivel celular, tisular y sistémico que afecta la homeostasis del organismo (Orasanu et al., 2009).

En condiciones de hiperglucemia las especies reactivas del oxígeno (ERO) se generan principalmente durante la autooxidación de la glucosa y en diferentes reacciones oxidativas (Anabela et al., 2006) que acompañan a la glicación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las modificaciones de las proteínas inducidas por carbohidratos son producidas durante la hiperglucemia crónica y son causadas por la interacción de la glucosa y de otros carbohidratos —como la fructosa y la glucosa-6-fosfato o sus derivados— con las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, para formar productos de glicación avanzada, conocidos como AGE o AGEs (Nessar et al., 2005; Houstis et al., 2006) (por sus siglas en inglés, advanced glycation end products). El EO está íntimamente vinculado a la glicación, por lo cual la acción combinada de estos dos procesos se conoce como glucooxidación. Las ERO conducen también a modificaciones estructurales de las proteínas, originando compuestos, en ocasiones, similares a los productos de glicación. Los compuestos resultantes de la lipoperoxidación, como el malondialdehído, se pueden unir a las proteínas y amplificar el daño inducido por la glucooxidación.

La DM es una enfermedad con una elevada incidencia en la población mexicana, y tiene un alza en su tasa de

mortalidad, debido a las complicaciones que genera. La nefropatía diabética (ND) es una de las principales complicaciones, y es la causa más frecuente de insuficiencia renal crónica terminal, ya que afecta al 40% de los pacientes con DM (Torres, 2002).

El estrés energético, osmótico y oxidativo en la DM puede inducir una respuesta generalizada tendiente a reparar o a matar a la célula por apoptosis, en esta condición tiene un papel central la NADPH oxidasa; esta enzima consiste de 5 subunidades y está asociada a la membrana, es la mayor fuente de anión superóxido (O_2^-) en condiciones de estrés (Quintanar y Salazar, 2009). Utilizando inhibidores de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), NADPH oxidasa, xantina oxidasa y de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria se ha demostrado que la producción de O_2^- en pacientes con DM es predominantemente mediado por la NADPH oxidasa. La actividad de NADPH oxidasa es significativamente mayor en tejido vascular obtenido de pacientes con DM y existen notables evidencias que la proteína cinasa C (PKC) activada por O_2^- y por diversas citocinas en el paciente con DM es capaz de activar la NADPH oxidasa.

La incubación con angiotensina II (Ang II) también ha demostrado que incrementa los niveles de ERO a través de la estimulación de NADPH oxidasa. La Ang II ha sido implicada en la expresión del receptor LOX-1 tipo lectina de las LDL-oxidadas. La inhibición de la generación de Ang II por inhibidores de la enzima convertidora de Ang II (ACE) y bloqueadores del receptor de Ang II (ARB) ha demostrado que se pueden atenuar estos procesos dañinos; sin embargo, se ha demostrado que el O_2^- compite con tales efectos, es decir, induce la generación de Ang II (Johansen et al., 2005).

Así mismo, la DM tiene múltiples y complejos efectos sobre las concentraciones y la actividad de las enzimas antioxidantes; por ejemplo, en el corazón, donde la DM causa cardiomiopatía y falla cardíaca crónica, la expresión de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) está disminuida, mientras que la catalasa (CAT) se incrementa en modelos de DM experimental. En pacientes con DM y falla cardíaca crónica, las 3 enzimas disminuyen su expresión en el músculo cardíaco y el entrenamiento con un ejercicio adecuado puede incrementar la expresión y la actividad de estas enzimas antioxidantes (Johansen et al., 2005).

También se ha observado que en pacientes con DM y falla renal crónica las concentraciones de isoprostano en plasma se correlacionan negativamente con el estatus antioxidante y la severidad de la enfermedad. La modulación de las enzimas antioxidantes en el órgano

blanco se ha propuesto que puede disminuir las complicaciones de las enfermedades cardíacas y renales, disminuyendo la posibilidad de tener insuficiencia renal crónica e insuficiencia cardíaca (Polidori et al., 2004). Este trabajo estudió el efecto de las vitaminas C y E como antioxidantes en el daño renal producido por la DM.

Metodología

Modelo animal experimental

Se utilizaron ratas Wistar machos, proporcionadas por el Bioterio de la FESI. Los organismos se seleccionaron en su etapa adulta con un peso de 200-250 g. Se mantuvieron en condiciones de temperatura entre 18-26 °C, humedad ambiental del 30% al 70% y ciclos de luz y oscuridad 12:12 h. Todos los organismos se mantuvieron bajo condiciones de agua y alimento *ad libitum*, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Para la inducción de la DM se utilizó estreptozotocina (STZ) (65 mg / kg de peso corporal), vía intraperitoneal, en buffer de citrato de sodio 10 mM, pH 4,5. Las ratas control (C) recibieron el vehículo (buffer de citrato de sodio 10 mM, pH 4,5) solo. Cuarenta y ocho horas después de la inyección de STZ, se determinó la concentración plasmática de glucosa; solo se incluyeron en el estudio los animales con glucemia > 300 mg/dL. Las ratas diabéticas se aleatorizaron en 3 grupos: 1) ratas diabéticas no tratadas (DM) que recibieron vehículo (solución salina), 2) ratas diabéticas tratadas con Vitamina E o C (250 mg/kg, vía oral) (DM + Vit E o Vit C) y vitamina E o C (500 mg/kg) durante 2 semanas.

Dos días antes de finalizar el experimento, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas para medir el consumo de agua, alimento y volumen urinario, para obtener muestras de orina para medir proteínas y creatinina.

Al final del estudio, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (45 mg / kg, vía ip). Se obtuvieron muestras de sangre para medir glucemia y creatinina. Ambos riñones se extrajeron rápidamente. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la norma NOM-062 ZOO-1969 (Secretaría de Agricultura, México) y la Guía del Instituto Nacional de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Publicaciones de los NIH No. 8023, revisadas en 1978).

Hipertrofia renal

La relación peso del riñón / peso corporal de la rata se utilizó como índice de hipertrofia renal. El riñón derecho fue fijado con para-formaldehído al 4% en solución salina amortiguada con fosfatos, se deshidrató mediante series graduadas con etanol, se embebió en parafina, para seccionarlo en cortes de 4 mm de espesor, se montó en

portaobjetos y se tiñó con hematoxilina-eosina (HE). Se visualizaron glomérulos y células tubulares proximales usando un microscopio óptico, las áreas se midieron a través del programa (Motic Images plus 2.0 ML, Richmond, Columbia Británica, Canadá). Para el área glomerular, se analizaron 50 glomérulos consecutivos por rata con un aumento de 10x. Para el área de células tubulares proximales, se contaron 100 células por campo a 40 X y se analizaron y promediaron 10 campos por portaobjetos. Finalmente, el DNA total y la proteína del tejido de la corteza se extrajeron y se cuantificaron mediante Trizol (Invitrogen, Grand Island, Nueva York, EE. UU.), La relación proteína / DNA se calculó como un índice de hipertrofia renal.

Aislamiento de DNA por el método de TRIZOL Reagent

Para el aislamiento de DNA se pesaron 100 mg de corteza renal y se homogeneizó con 1 mL de TRIZOL Reagent Invitrogen, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se agregó 0.2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 s, después se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12, 000 x g por 15 min a 4 °C. Se removió la fase acuosa y se precipitó el DNA con 0.3 mL de etanol al 100%, se mezcló por inversión, se incubó 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 2000 x g durante 5 min a 4 °C, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla (DNA) tres veces durante 30 min con citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10%, agitando periódicamente; entre cada lavada se centrifugó 5 min a 2000 x g a 4 °C después de centrifugar por última vez, se resuspendió la pastilla en 1.5 mL de etanol (75%) durante 15 min, mezclando periódicamente. Se centrifugó a 2000 x g durante 5 min a 4°C y se removió el sobrenadante. Se agregaron 400 µL de NaOH 8 mM y se resuspendió nuevamente. Se centrifugó a 2000 x g durante 5 min a 4 °C, se separó el sobrenadante y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 20) a 260 y 280 nm.

Análisis por inmunoblot de la expresión del receptor AT₁

Se obtuvieron muestras de corteza renal para determinar la expresión del receptor AT₁ mediante inmunoblot, El tejido renal se homogeneizó en Tris 100 mM (hidroximetil - aminometano - tris - hidrocloreuro, Sigma, St Louis, MO, EE. UU.), pH 7,4, en presencia de inhibidores de proteasas sin EDTA, Roche, (Alemania), se centrifugó a 10, 000 xg. La concentración de proteínas se cuantificó utilizando el método de Bradford. Se cargaron 50 mg de proteína en un mini-gel SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinideno (PVDF) (Amersham Hybond-ECL, GE Health Care, Buckinghamshire, Reino Unido). Las

membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en solución de TBST al 0.05% con Tween 20 durante dos horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 16 h a 4°C con una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal de conejo contra AT1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EE. UU.).

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con tampón TBST y se incubaron con una dilución 1: 1000 de anticuerpo secundario IgG de cabra anti - conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (Zymed, Invitrogen, Grand Island, Nueva York, EE. UU.) a temperatura ambiente. por 2 h. La visualización se realizó con un kit de transferencia de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Luminol, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EE. UU.). Las películas obtenidas se escanearon y digitalizaron, la intensidad de la banda se midió mediante análisis informático utilizando el programa Multi Gauge, Fuji Film Science y Lab2003 (Fuji Photo Film Co., LTD). Todas las membranas se volvieron a bloquear y se incubaron con anticuerpo para β -actina (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EE. UU.).

Evaluación del estrés oxidativo

Para la actividad de la catalasa se realizó a través del procedimiento descrito por Aebi (1983), a 100 μ l de homogeneizado se le adicionó una solución de H₂O₂ al 0.5% en PBS a pH 7. El cambio de absorbancia a 240 nm, se registró en un espectrofotómetro (Genesys 20).

La actividad de superóxido dismutasa se cuantificó mediante la técnica descrita por Beauchamp y Fridovich (1971), que utiliza xantina oxidasa y en la presencia de una mezcla de reacción se reduce el nitroazul de tetrazolio, en presencia de superóxido dismutasa, enseguida se determina la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm.

La actividad de glutatión peroxidasa se determinó mediante el procedimiento descrito por Paglia y Valentine (1967).

Análisis estadístico

Todos los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para determinar la significancia entre los grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de la prueba post hoc de Tukey y la prueba se consideró significativa cuando el valor de $P < 0.05$ y se utilizó el programa Graph Pad Prisma versión 5 para Windows, San Diego, California, U.S.A.

Resultados y discusión

Efecto de las vitaminas C y E sobre el modelo de DM

Después de 48 h de la administración de STZ se observó un aumento significativo de la glucemia en el grupo diabético (DM) (495 ± 47 mg/dL) respecto al grupo control (C) (120 ± 7 mg/dL), este aumento se mantuvo durante las dos semanas experimentales

Los grupos a los que se les administraron las vitaminas no mostraron cambios en las cifras de hiperglucemia, estas se mantuvieron altas durante todo el experimento. DM+VE 250 mg/kg (397 ± 57 mg/dL), DM+VE 500 mg/kg (467 ± 56 mg/dL), DM+VC 250 mg/kg (515 ± 27 mg/dL) y DM+VC 500 mg/kg (450 ± 56 mg/dL).

La ingesta de agua en 24 h fue mayor en el grupo de DM con respecto al Control (173 ± 13 mL vs 43 ± 9.69 mL). DM+VE 250 mg/kg (145 ± 32 mL), DM+VE 500 mg/kg y DM+VC 500 mg/kg, consumieron menor cantidad de agua en comparación al DM.

El consumo de alimento en 24 h fue mayor en los grupos con DM+VE 250 mg/kg (35 ± 8 g), DM+VE 500 mg/kg (33 ± 3 g), DM+VC 250 mg/kg (32 ± 14 g) y DM+VC 500 mg/kg (29 ± 9 gr) mientras que el para el control fue de (23 ± 8 g). El DM+VE 500 mg/kg presentó diferencia significativa respecto al DM (40 ± 3 g). El volumen urinario en 24 h fue mayor en el DM+VE 250 mg/kg (76 ± 25 mL), DM+VE 500 mg/kg (86 ± 16 mL), DM+VC 250 mg/kg (94 ± 44 mL) y DM+VC 500 mg/kg (88 ± 25 mL) en comparación al control (12 ± 5 mL). Sin embargo, el DM+VE 250 mg/kg presentó una disminución significativa del volumen urinario respecto al DM (113 ± 10 mL).

Efecto de las vitaminas C y E sobre la hipertrofia renal

El peso del riñón del DM (0.88 ± 0.01 mg/g) aumentó en relación al peso del riñón del C (0.65 ± 0.04 mg/g). El peso renal de los DM+VE 250 mg/kg (0.81 ± 0.01 mg/g) y DM+VE 500 mg/kg (0.82 ± 0.02 mg/g) mostraron disminución significativa con respecto al DM. Los DM+VC 250 mg/kg (0.90 ± 0.10 mg/g) y DM+VC 500 mg/kg (0.861 ± 0.041 mg/g) no presentaron disminución del peso del riñón.

El cociente de proteínas/DNA fue mayor en el DM (108 ± 30 u.a.) en comparación que en el C (66 ± 21 u.a.). Mientras que los DM+VE 250 mg/kg, DM+VE 500 mg/kg, DM+VC 250 mg/kg y DM+VC 500 mg/kg presentaron una disminución significativa del cociente de proteínas/DNA respecto al DM, (64 ± 7 y 65 ± 11 u.a., 80 ± 3 y 63 ± 7 u.a.) (Fig 1).

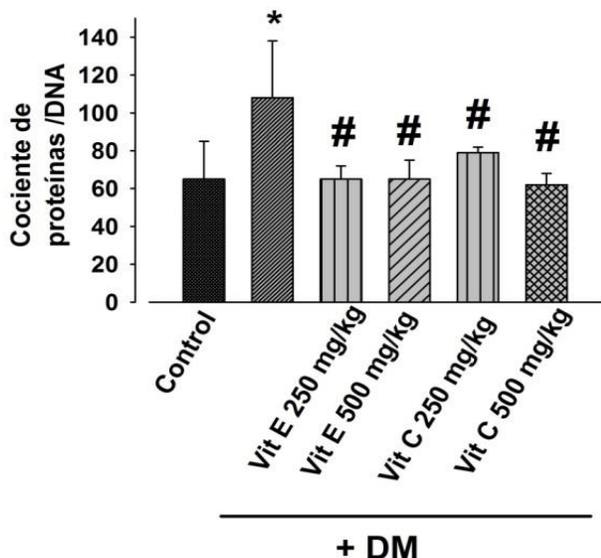


Figura 1. Efecto de las vitaminas C y E sobre el cociente proteínas/DNA de homogeneizados de riñón provenientes de ratas diabéticas. Cada punto corresponde a la media \pm EEM. * $p < 0.05$ C vs DM; # $p < 0.05$ DM vs tratamientos, $n = 6$.

El área celular de los túbulos proximales incrementó significativamente en el DM ($140 \pm 2 \mu\text{m}^2$) respecto al Control ($105 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$). En tanto que en los DM+VE de 500 mg/kg ($115 \pm 1 \mu\text{m}^2$), DM+VC 250 mg/kg ($125 \pm 0.6 \mu\text{m}^2$) y DM+VC 500 mg/kg ($123 \pm 2 \mu\text{m}^2$) se observó una disminución significativa en el área celular de los túbulos proximales con respecto al DM, en el DM+VE 250 mg/kg ($128 \pm 2 \mu\text{m}^2$) no se observaron diferencias significativas respecto al DM. (Fig. 2).

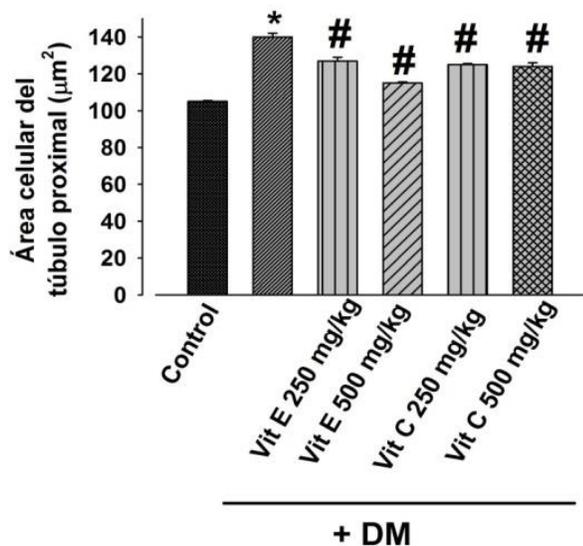


Figura 2. Efecto de las vitaminas C y E sobre el área celular de los túbulos proximales de ratas diabéticas. Se realizó un conteo de 100 células. Cada punto corresponde a la media \pm EEM. * $p < 0.05$ C vs DM; # $p < 0.05$ DM vs tratamientos, $n = 6$.

Efecto de las vitaminas C y E sobre la proteinuria y la depuración de creatinina

La concentración de proteínas en orina aumentó significativamente en el DM ($56 \pm 14 \text{ mg}/24 \text{ h}$) respecto al Control ($29 \pm 6 \text{ mg}/24 \text{ h}$). En los DM+VE y DM+VC tratados con la dosis de 500 mg/kg se observó una disminución significativa de la proteinuria ($41 \pm 5 \text{ mg}/24 \text{ h}$ y $33 \pm 7 \text{ mg}/24 \text{ h}$ respectivamente). En los grupos DM+VE 250 mg/kg ($45 \pm 8 \text{ mg}/24 \text{ h}$) y DM+VC 250 mg/kg ($47 \pm 12 \text{ mg}/24 \text{ h}$) también disminuyó la proteinuria, pero no fue significativa (Fig. 3).

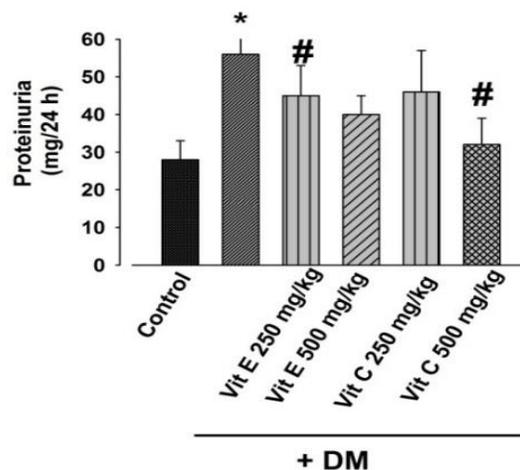


Figura 3. Efecto de las vitaminas C y E sobre la proteinuria en ratas DM. Cada punto corresponde a la media \pm EEM. * $p < 0.05$ C vs DM; # $p < 0.05$ DM vs tratamientos, $n = 6$.

La depuración de creatinina del Control fue de $76 \pm 11 \text{ mL}/\text{min}$, en el DM se observó una disminución significativa de la depuración de creatinina la cual fue de $23 \pm 5 \text{ mL}/\text{min}$. En tanto en los DM+VE y DM+VC con ambas dosis, el aumento en la depuración de creatinina fue significativo (Fig. 4).

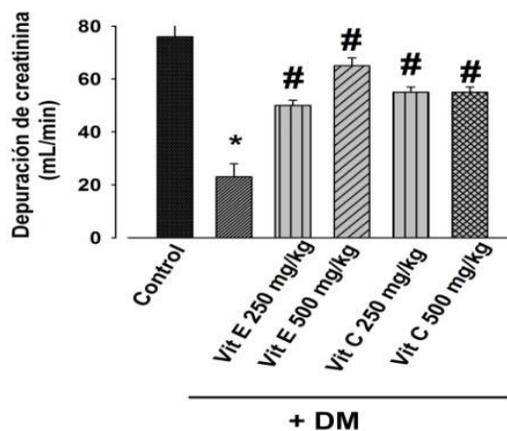


Figura 4. Efecto de las vitaminas C y E sobre la depuración de creatinina en ratas DM. Cada punto corresponde a la media \pm EEM. * $p < 0.05$ C vs DM; # $p < 0.05$ DM vs tratamientos, $n = 6$.

Actividad antioxidante enzimática

Catalasa La actividad de la catalasa disminuyó significativamente en el DM (132 ± 7 U/mg) respecto al Control (183 ± 4 U/mg). Se observó aumento de la actividad de la catalasa en todos los grupos DM+VE 250 mg/kg (152 ± 7 U/mg), DM+VE 500 mg/kg (147 ± 7 U/mg), DM+VC 250 mg/kg (143.17 ± 11.36 U/mg) y DM+VC 500 mg/kg (166 ± 9 U/mg), sin embargo solo en el DM+VC 500 mg/kg (166 ± 9 U/mg) la actividad de la catalasa fue significativa (Fig.5).

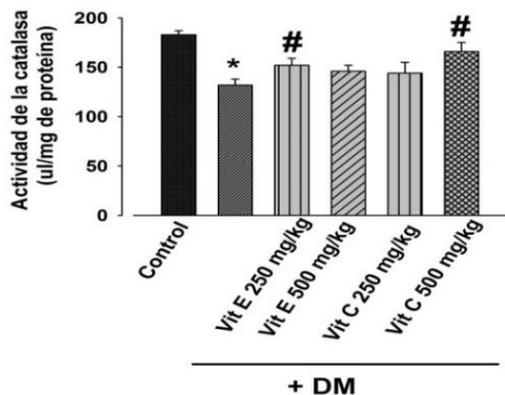


Figura 5. Efecto de las vitaminas C y E sobre la actividad enzimática de la catalasa en corteza renal de ratas DM. Cada punto corresponde a la media \pm EEM. * $p < 0.05$ C vs DM; # $p < 0.05$ DM vs tratamientos, $n = 6$.

Superóxido dismutasa

El DM presentó una disminución significativa de la actividad de la SOD (21 ± 2 U/mg) en relación al Control (37 ± 4 U/mg). El DM+VE 250 mg/kg (34 ± 3 U/mg), DM+VE 500 mg/kg (44 ± 3 U/mg), DM+VC 250 mg/kg (36 ± 3 U/mg) y DM+VC 500 mg/kg (44 ± 4 U/mg) presentaron un aumento significativo de la actividad respecto al DM (Fig.6).

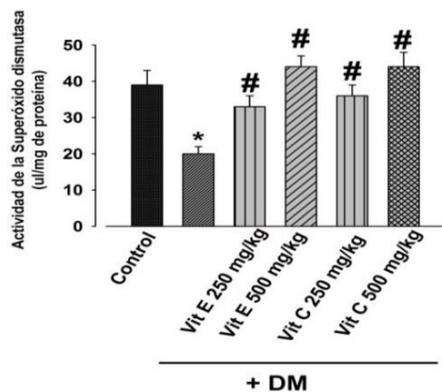


Figura 6. Efecto de las vitaminas C y E sobre la actividad de superóxido dismutasa en corteza renal de ratas DM. Cada punto corresponde a la media \pm EEM. * $p < 0.05$ C vs DM; # $p < 0.05$ DM vs tratamientos, $n = 6$.

Glutación peroxidasa

El DM (6 ± 0.4 U/mg) presentó una disminución significativa de la actividad enzimática de la GPx respecto al Control (9 ± 0.4 U/mg). En cuanto a los GDM+VE 250 mg/kg (10 ± 0.8 U/mg), GDM+VE 500 mg/kg (11 ± 0.80 U/mg), GDM+VC 250 mg/kg (10 ± 0.40 U/mg) y GDM+VC 500 mg/kg (10 ± 0.30 U/mg) presentaron un incremento significativo de la actividad enzimática de la GPx respecto al G-DM (Fig.7).

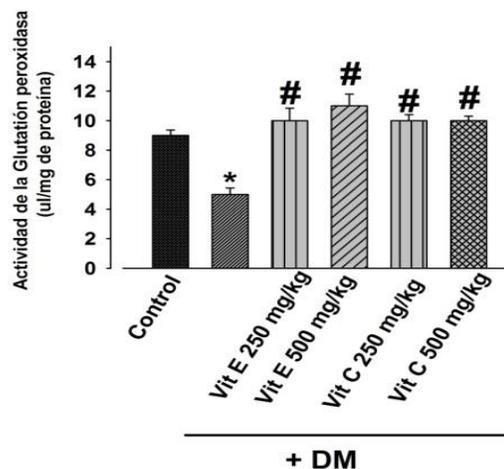


Figura 7. Efecto de las vitaminas C y E sobre la actividad enzimática de glutación peroxidasa en corteza renal de ratas DM. Cada punto corresponde a la media \pm EEM. * $p < 0.05$ C vs DM; # $p < 0.05$ DM vs tratamientos, $n = 6$.

Expresión del receptor AT₁ en corteza renal

La expresión del receptor AT₁ en la corteza renal incrementó en el DM (1.2 ± 0.22 u.a.) respecto al Control (0.6 ± 0.15 u.a.). Los grupos DM+VE tratados con 250 y 500 mg/kg, así como el DM+VC 500 mg/kg, disminuyeron la expresión del AT₁ respecto al DM (E 250 mg/kg, 0.86 ± 0.07 u.a.; E 500 mg/kg, 0.76 ± 0.3 u.a.; C 500 mg/kg, 0.73 ± 0.3 u.a.). Sin embargo, el DM+VC 250 mg/kg (1.3 ± 0.4 u.a.) presentó un incremento en la expresión del AT₁ en corteza renal respecto al Control (Fig. 8).

Existen varios modelos de inducción de la DM en animales, el método más confiable, y por lo tanto comúnmente empleado, es la administración intraperitoneal de STZ. Por lo que en este estudio evaluamos el efecto de las vitaminas C y E como antioxidantes en el daño renal producido por la DM utilizando este modelo. Se ha mostrado que la inyección intraperitoneal de estreptozotocina 65 mg/kg a ratas Wistar adultas induce DM dentro de los primeros 2 a 4 días. La STZ ingresa a las células β a través del transportador GLUT-2, impidiendo el paso de la glucosa al interior de la célula β lo que genera daño celular y un déficit en la expresión de proinsulina generando un

estado de hiperglicemia (Choudhari et al., 2016). La administración de las vitaminas C y E, no disminuyeron la hiperglucemia. Resultados semejantes se observaron en pacientes diabéticos tratados con dosis bajas de vitamina E (200 mg/kg) y vitamina C (2 g/día), en los cuales la hiperglucemia permaneció sin cambios, la hemoglobina glucosilada disminuyó significativamente en un plazo de 4 a 8 semanas (Obregón et al., 2006; Zatz et al., 1986). La disminución de la hemoglobina glucosilada puede estar relacionada con la capacidad antioxidante de la vitamina E.

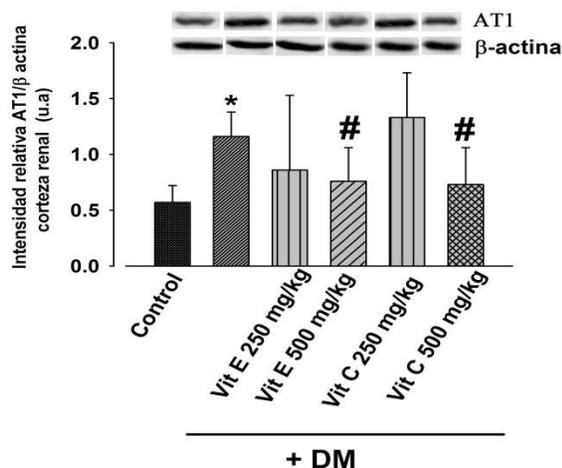


Figura 8. Efecto de las vitaminas C y E sobre la expresión del receptor AT₁ en corteza renal de ratas DM. Cada punto corresponde a la media ± EEM. *p < 0.05 C vs DM; #p < 0.05 DM vs tratamientos, n = 6.

En los animales con DM se observó disminución del peso corporal, que es debido a la falta de glucosa en las células del músculo esquelético y en los adipocitos, por lo que para cubrir la demanda de energía se induce la gluconeogénesis por hidrólisis de proteínas provenientes del tejido muscular y a través de la degradación de los triglicéridos provenientes del tejido adiposo (Zari y Al-Thebaiti, 2018). La administración de Vit E y/o Vit C no modificaron el peso corporal de las ratas DM. Puesto que la deficiencia insulínica disminuye la entrada de glucosa a las células del tejido muscular, adiposo e hígado, estimula el catabolismo de las grasas y proteínas, para la generación de glucosa lo que produce la pérdida de peso y desencadena la polifagia (Goodman, 2003).

La poliuria es causada por el exceso de glucosa filtrada por los riñones que no es reabsorbida por los túbulos renales, por lo tanto, es excretada en la orina. La glucosa no reabsorbida genera retención de agua por ósmosis en el túbulo contorneado proximal y por ello el organismo elimina un volumen mayor de agua y electrolitos. Los resultados obtenidos mostraron que las ratas DM

excretaron un volumen mayor de orina en comparación con las ratas normoglucémicas; la polidipsia es un mecanismo compensatorio que se genera ante el volumen de líquido perdido a consecuencia del aumento en la excreción de agua (Siddiqui et al., 2010). La ingesta de agua disminuyó de manera significativa en los grupos de ratas DM tratadas con las dosis altas de las vitaminas. Sin embargo, el único grupo con disminución significativa de volumen urinario fue el de Vit E (250 mg/kg), lo que se puede atribuir a un aumento del volumen urinario en ratas con DM inducida con STZ (Arruzazabala et al., 2010). La disminución en la captación de glucosa por las células musculares y adiposas provoca hiperglucemia lo que satura los sistemas de transporte renal y lleva a glucosuria, que a su vez induce diuresis osmótica y aumento del volumen urinario (Marther y Pollock, 2011).

Varios estudios han mostrado que en etapas tempranas del desarrollo de la nefropatía diabética (ND) se produce un aumento en el peso de los riñones, así como del área de las células del túbulo proximal; dicha alteración estructural se conoce como hipertrofia renal (Meza et al., 2017). En el presente estudio se determinó la hipertrofia renal a través de la relación peso renal/peso corporal total y se asoció con la presencia de proteínas en la orina, estos son dos indicadores que nos permiten inferir el daño que está sufriendo la barrera de filtración glomerular debido al estado hiperglucémico persistente, ya que esta barrera impide el paso de macromoléculas como las proteínas del plasma, por su tamaño, su forma y su carga eléctrica negativa (Dai et al., 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos, las ratas DM presentaron hipertrofia renal y proteinuria con respecto al control, lo que sugiere un daño en la barrera de filtración glomerular.

En este estudio se observó que la administración de la vitamina E a ratas DM en ambas dosis disminuyó el peso de los riñones. Mientras que en los grupos con VC 500 mg/kg, VE 250 mg/kg y VE 500 mg/kg disminuyeron el área de las células del túbulo proximal, al igual que el cociente de proteínas/DNA. Estudios recientes sugieren que el aumento del peso del riñón y el tamaño de las células del túbulo proximal se debe a que las células renales son estimuladas por la hiperglucemia y el flujo de glucosa a las células renales es modulado por el transportador GLUT-1; se ha demostrado que la expresión de este transportador es estimulada por la hiperglucemia, lo que incrementa la reabsorción de la glucosa y promueve la actividad de la Ang II, estimulando la producción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF-β) el cual tiene una importante participación en la hipertrofia renal (Azizi et al., 2004; Núñez, 2012), lo cual nos sugiere que las vitaminas C y E disminuyen los daños causados por el EO

y contrarrestan a los radicales libres (RL) y con ello disminuyó la estimulación del TGF- β , factor principal del crecimiento celular (Huang y Preisig, 2000; Makino et al., 2002).

En este estudio fue posible observar que disminuyó la actividad de las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutación peroxidasa (SOD, CAT y GPx) en ratas DM y ello puede ser causado por el incremento de los RL; numerosos reportes han señalado que cuando los RL se acumulan contribuyen a la reducción de la actividad enzimática antioxidante en pacientes diabéticos y con ND.

La sobreproducción del anión superóxido (O_2^-) y de otras especies reactivas genera estrés oxidativo, responsable de la disminución de la actividad de estas enzimas. La SOD se inhibe cuando se expone a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Clapés et al., 2001). En los grupos de ratas diabéticas que recibieron el tratamiento con vitamina C y/o E se observó que aumentó la actividad antioxidante de las enzimas: SOD, CAT y GPx.

Se ha demostrado que la inhibición del SRA mejora la sensibilidad a la insulina, mediante el aumento del flujo sanguíneo muscular, lo cual favorece la utilización de glucosa.

Con los resultados obtenidos en este estudio se observó un aumento significativo en la expresión del receptor AT₁ en la corteza renal de ratas DM. El receptor AT₁ disminuyó significativamente con la administración de las vitaminas E y C.

Conclusiones

La administración de las vitaminas C y E restableció la función renal en ratas diabéticas; aumentó la depuración de creatinina y disminuyó la proteinuria.

Con la administración de las vitaminas C y E se observó una disminución del peso del riñón, del área celular del túbulo proximal y del coeficiente de proteínas/DNA. Lo que determinó un retraso en el desarrollo de la hipertrofia renal en ratas con DM.

Disminuyó el estrés oxidativo en ratas diabéticas con la administración de las vitaminas C y E, aumentando la actividad antioxidante de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutación peroxidasa.

Las vitaminas C y E ejercen un efecto protector ante el sistema renina angiotensina, al reducir la expresión del receptor AT₁ mientras que aumentan la expresión del receptor AT₂ en ratas diabéticas.

Referencias

- American Diabetes Association. Executive summary: Standards of medical care in diabetes, (2012). *Diabetes Care*, 35(1): 4–10.
- Anabela RP, Carlos P.M., (2006). Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycaemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212: 167-78.
- Arruzazabala M., Y., Ravelo, D., Carbajal V., Molina, R., Mas. (2010). Efecto del extracto de semillas de uva sobre la cistopatía diabética inducida por estreptozotocina en ratas. *Rev Cien Biol* 41(2):99-102
- Azizi M, Menard J. (2004). Combined blockade of the renin-angiotensin with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Circulation* 109: 2492-2499.
- Clapés S., Torres O., Companioni M., Villariño U., Broche F., Céspedes M. (2001). Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cub Invest Biomed* 20: 2: 93-98.
- Choudhari VP, Gore KP, Pawar AT. (2017). Antidiabetic, antihyperlipidemic activities and herb-drug interaction of a polyherbal formulation in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ayurveda Integr Med*, 8(4):218-225.
- Dai H, Liu Q, Liu B. (2017). Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*, 2615286.
- Goodman y Gilman. (2017). Las bases farmacológicas de la terapéutica. 18ª ed. Vol. 1. *McGraw-Hill Inter*
- Huang H., Preisig P. (2000). G1 kinases and transforming growth factor beta signaling are associated with a growth pattern switch in diabetes induced renal growth. *Kidney Int* 58: 162–172.
- Houstis N., Evan D., Rosen, Lander E. S., (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440: 944-8.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A., (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*, 29; 4(1):5.
- Makino H. Tanaka I. Mukoyama M. Sugawara A, Mori K. MUuro S. Sukanami T. Yahata K. Ishibashi R. Ohuchida S. Maruyama T. Narumiya S., Nakao K., (2002). Prevention of Diabetic Nephropathy in Rats by Prostaglandin E Receptor EP1 Selective Antagonist. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1757–1765

- Mather A., Pollock C. (2011). Glucose handling by the kidney. *Kidney Int.*, 79:S1-S6
- Maldonado-Saavedra O, Jiménez-Vázquez EN, Guapillo-Vargas MRB. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*. Disponible en http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf
- Nessar A. (2005). Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 67: 3-21.
- Núñez A. (2012). Participación de la angiotensina (1-7) en la hipertrofia renal temprana en un modelo de diabetes mellitus. Tesis de maestría en ciencias biológicas. IPN Pag. 55.
- Polidori MC, Praticó D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. (2004). Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Fail*, 10(4):334-338.
- Obregón, O., H., Vecchionacce, S., Brito, M., Lares, J., Castro, X., Ramírez y O., Villaroel, (2006). Efecto antiglicosilante de las vitaminas E y C. *Arch Ven Farma y Terap*, 24(001):264-271.
- Orasanu G, Plutzky J. (2009). The pathologic continuum of diabetes vascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 53 (5): 35.
- Quintanar-Escorza, MA y Calderón-Salinas, J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB*, 28(3):89-101.
- Siddiqui S, Khan MR, Siddiqui WA. (2010). Comparative hypoglycemic and nephroprotective effects of tocotrienol rich fraction (TRF) from palm oil and rice bran oil against hyperglycemia induced nephropathy in type 1 diabetic rats. *Chem-Biol Int*, 188:651-8.
- Zari TA, Al-Thebaiti MA. (2018). Effects of *Caralluma russeliana* stem extract on some physiological parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes. Metab Syndr Obes*, 12; 11:619-631.
- Zatz, R., B., Dunn, T., Meyer, S., Anderson, H., Rennke y B., Brenner. (1986). Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77:1925-1930.