

Defensas antioxidantes en la insuficiencia renal crónica experimental

Antioxidant defenses in the experimental chronic renal failure

Miriela Betancourt Valladares^I, Ygber Luis González de la Cruz^{II}, Neyda Fernández Franch^{III}, Norma Gutiérrez Méndez^{IV}, José Luis Cadenas Freixas^V

^I Especialista de I Grado en Fisiología Normal y Patológica. Asistente. Facultad de Estomatología. Universidad de Ciencias Médicas. Camagüey, Cuba.

^{II} Especialista de I Grado en Medicina Interna. Asistente. Hospital Provincial Docente "Amalia Simoni". Camagüey, Cuba.

^{III} Especialista de II Grado en Bioquímica. Profesora Auxiliar. Facultad de Estomatología. Universidad de Ciencias Médicas. Camagüey, Cuba.

^{IV} Instructora. Facultad de Medicina. Universidad de Ciencias Médicas. Camagüey, Cuba.

^V Doctor en Ciencias Fisiológicas. Profesor Titular. Facultad de Estomatología. Universidad de Ciencias Médicas. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar el comportamiento de las defensas antioxidantes en relación con las modificaciones funcionales progresivas en la insuficiencia renal crónica experimental.

MÉTODOS: Estudio experimental controlado en 40 ratas Wistar provocando insuficiencia renal por ablación de 5/6 de la masa renal. La muestra se dividió en 4 grupos de 10 animales, 1 grupo control y 3 experimentales (E) sometidos a extirpación del riñón derecho y ligadura de dos ramas de la arteria renal izquierda. El grupo experimental E-I evolucionó 2 sem después de la nefrectomía, el grupo E-II 4 sem y el grupo E-III durante 6 sem. Se realizó aclaramiento plasmático de ácido paraminohipúrico (PAH) e inulina (I) para medir flujo plasmático renal efectivo (FPR) e intensidad de filtración glomerular (IFG) respectivamente. Los cambios de IFG y FPR permitieron constatar las modificaciones funcionales a medida que progresaba la insuficiencia renal. Los indicadores de defensa antioxidante incluyeron la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de glutatión reducido (GSH), medidos en homogenado de riñón. Se realizó análisis de regresión lineal para relacionar cambios funcionales y defensas antioxidantes.

RESULTADOS: La función renal decreció progresivamente después de la nefrectomía. Se produjo disminución de la actividad de la SOD seguida de una superinducción a las 6 semanas y los niveles de GSH comenzaron a disminuir en la 4ta sem posnefrectomía.

CONCLUSIONES: Los cambios en los indicadores de defensa antioxidante a nivel renal sugieren que el estrés oxidativo aumenta en el órgano correlacionándose con la pérdida progresiva de la función renal.

Palabras clave: Insuficiencia renal crónica experimental, filtrado glomerular, flujo plasmático renal, defensa antioxidante, estrés oxidativo.

ABSTRACT

OBJECTIVE: to evaluate the changes on antioxidant defenses in kidneys while function changes on remaining tissue during progression of renal failure after performing subtotal nephrectomy.

METHODS: an experimental trial in 40 Wistar rats was done. The renal failure was induced by surgical ablation of 5/6 of the renal mass, removing the right kidney and tying two branches of the left renal artery to 30 rats; 3 study groups were formed and followed over a period of 2, 4, and 6 weeks. The remaining group of rats was used as control. Functional remainder state was evaluated by measurement of the Glomerular Filtration Rate (GFR) and effective Renal Plasmatic Flow (RPF), through renal plasmatic clearance methods. Measurement of reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase activity (SOD) in renal mass were used as markers of antioxidant defense. Lineal correlation was used to analyze correlations between progressive functional changes and oxidative status.

RESULTS: Progressive decreasing of both GFR and RPF were noted. SOD activity diminished initially followed by a super induction at 6th week and GSH levels decreased markedly at 4th week after nephrectomy.

CONCLUSION: The variations of antioxidant defenses markers on renal tissue suggest that oxidative stress increases in the remainder kidney correlated to the progressive reduction of the renal function.

Key words: Chronic renal failure, glomerular filtration, renal plasmatic flow, filtration fraction, oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

La insuficiencia renal crónica (IRC) es la reducción lenta y progresiva de la filtración glomerular, que se asocia a la pérdida de las restantes funciones del riñón.^{1,2} Estudios experimentales han mostrado que la función renal residual es resultado de cambios adaptativos de las nefronas remanentes que llevan inicialmente al aumento del flujo sanguíneo, de la presión y filtración glomerular, los que causan glomeruloesclerosis y desatan un círculo vicioso que hace irreversible el avance de la insuficiencia renal hacia su etapa terminal independientemente de la enfermedad causal.^{1,3} La teoría de la hiperfiltración, muy bien avalada experimentalmente, aún tiene puntos oscuros y parece tratarse de un fenómeno multifactorial con implicación de diversos mediadores, se destaca la Angiotensina II, que ha sido implicada en la progresión hacia la insuficiencia renal terminal de la mayoría de las

enfermedades renales. Entre otros efectos, la Angiotensina II es un importante inductor de la producción de O₂⁻ y por ende aumenta los niveles de estrés oxidativo.^{4,5}

Estudios realizados en pacientes con IRC, sugieren que estos se encuentran en una situación de estrés oxidativo y que el grado de estrés oxidativo está correlacionado con el grado de IRC.^{6,7} Se ha descrito que se produce una estimulación de la respuesta de las enzimas antioxidantes, lo que demuestra que el aumento de actividad antioxidante es la consecuencia del exceso de oxidación, en un intento de restaurar la homeostasis celular.⁸

Las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos son los radicales libres derivados del oxígeno (EROs).^{9,10} La mayor parte de los estudios realizados se han basado en la medición directa de productos oxidantes e indirectamente midiendo productos de peroxidación lipídica en los tejidos renales.^{6,11}

A la luz de los resultados obtenidos, en un estudio precedente de los cambios secuenciales en la función renal en IRC experimental en el modelo de nefrectomía subtotal por ablación de 5/6 de la masa renal en ratas, con la determinación del daño oxidativo a lípidos y proteínas,⁷ nos motivamos a realizar la presente investigación en la que utilizando el mismo modelo se estudian los cambios progresivos en la actividad de la enzima superóxido dismutasa y en las concentraciones del glutatión reducido como indicadores de defensa antioxidante en el riñón remanente a medida que avanza la IRC, con el objetivo de evaluar el comportamiento de las defensas antioxidantes en el riñón en relación con las modificaciones funcionales en el tejido remanente a medida que progresa la insuficiencia renal en ratas sometidas a nefrectomía subtotal.

MÉTODOS

Se trabajó con un grupo de 40 ratas Wistar, con un peso aproximado de 180 g. La muestra se dividió en 4 grupos de 10 animales, un grupo control (C) constituido por ratas que no fueron sometidas a proceder quirúrgico y 3 grupos experimentales (E) sometidos a nefrectomía subtotal por ablación de 5/6 de la masa renal, eliminando el riñón derecho y ligando 2 ramas de la arteria renal izquierda. El grupo experimental E-I evolucionó durante 2 sem después de la nefrectomía subtotal, el grupo experimental E-II evolucionó durante 4 sem y el grupo experimental E-III durante 6 sem. El último día de evolución de cada animal se realizó el aclaramiento plasmático de ácido paramino-hipúrico (PAH) e inulina (I) para medir el flujo plasmático renal efectivo (FPR) y la intensidad de filtración glomerular (IFG) respectivamente, por el método multicompartimental. Los cambios de la IFG y el FPR permitieron evaluar las modificaciones funcionales a medida que progresaba la insuficiencia renal. La masa renal fue extraída y congelada, para la obtención posterior del homogenado del tejido. Se utilizó el sobrenadante para la medición de indicadores de defensa antioxidante que incluyeron la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de glutatión reducido (GSH).

Proceder para la medición de los aclaramientos plasmáticos: se obtuvieron 12 muestras de sangre donde el PAH y la I fueron determinados en filtrados liberados de proteínas por sulfato de cadmio, utilizando para el PAH la técnica fotocolorimétrica de Bratton y Marshall, modificada por Homer W. Smith y para la inulina el método directo del resorcinol sin tratamiento alcalino. Con las concentraciones plasmáticas de PAH e insulina se calcularon los aclaramientos mediante el análisis de descomposición multicompartimental de las curvas de

desaparición respectivas de dichas sustancias en el plasma.^{7,12} Los resultados fueron expresados en mililitros por min por 100 g de peso rata (mL/min/100 g).

Técnica para la determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD): la determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa se llevó a cabo por la técnica establecida por *Marklund* y otros.¹³ La densidad óptica se leyó a 420 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 8 UV-VIS. Los resultados se expresaron en unidades por mililitros por minuto (U/mL/min).

Técnica para la determinación del glutatión reducido (GSH): el GSH presente en la muestra desproteinizada reacciona con el reactivo de Ellman [5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)] para rendir un compuesto coloreado [ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB)] que absorbe la luz a 412 nm. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro marca Spectronic Genesys 8 UV-VIS. Para el cálculo de los resultados se creó una curva de calibración empleando para ello GSH como patrón.¹² Los resultados se expresaron en microgramos por mililitros ($\mu\text{g/mL}$).

Análisis estadístico: para resumir la información de las variables se utilizaron medidas de resumen y dispersión como la media y la desviación estándar. Se realizó ANOVA de una vía de efecto fijo para estudiar el cambio de las variables en el tiempo y la trayectoria entre los grupos. Se realizó el análisis de regresión lineal para establecer relación entre la función renal y los marcadores de estrés oxidativo. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran las medias obtenidas para el FPR, cuyo valor va declinando, aunque se hace significativo el cambio a las 4 sem posnefrectomía.

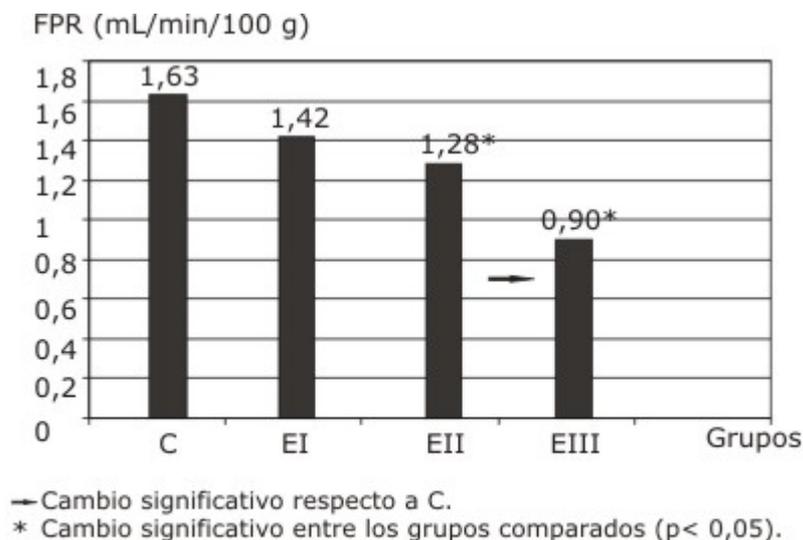


Fig. 1. Variaciones del flujo plasmático renal efectivo en los grupos estudiados

En la figura 2 se observan los cambios en la IFG, cuyo valor disminuyó incluso de manera significativa a las 2 sem posnefrectomía (grupo E- II), respecto a los animales sin nefrectomizar y continuó disminuyendo hasta las 6 sem.

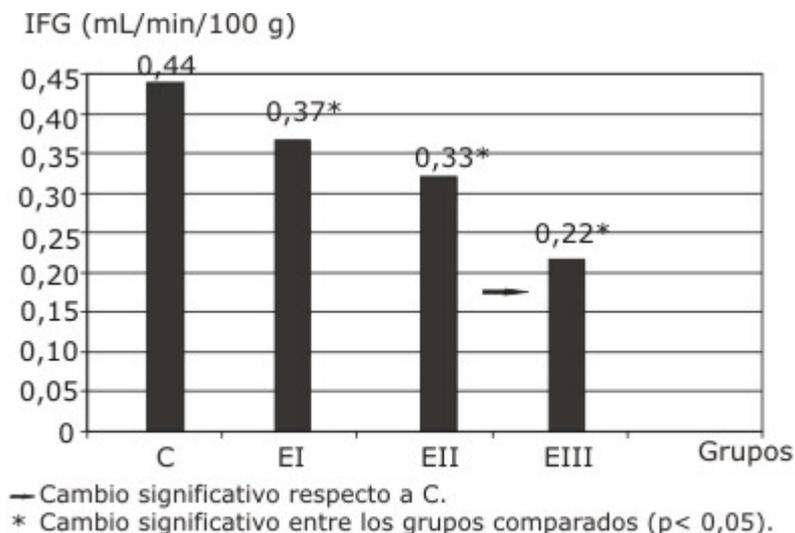


Fig. 2. Variaciones de la intensidad de filtración glomerular en los grupos estudiados.

El análisis de la enzima superóxido dismutasa mostró disminución de su actividad en los grupos experimentales E-I y E-II, respecto al control, significativo para E-II; sin embargo en los animales del grupo E-III se constató un aumento significativo de la actividad de la SOD, no solo respecto al grupo E-II sino también respecto a los controles (Fig. 3).

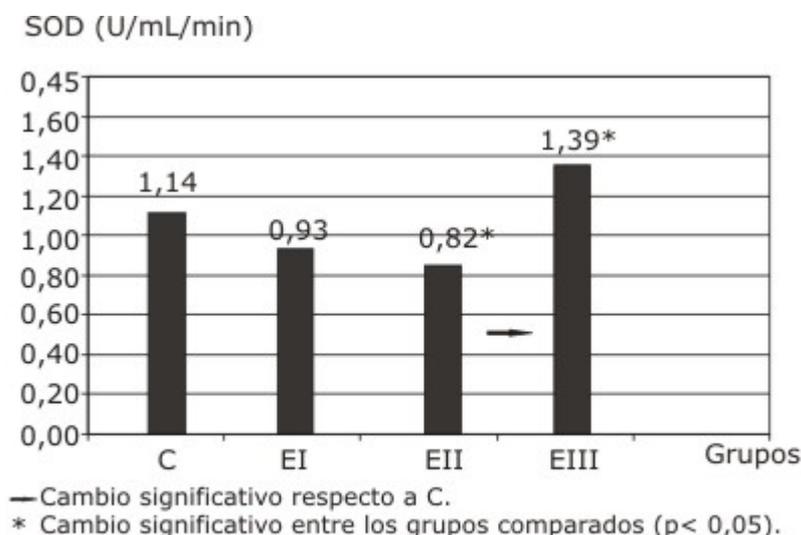


Fig. 3. Cambios en la actividad de la enzima superóxido dismutasa a nivel renal en los grupos estudiados.

La determinación del glutatión reducido (GSH) mostró disminución significativa en los grupos experimentales E-II y E-III respecto al grupo control (Fig. 4).

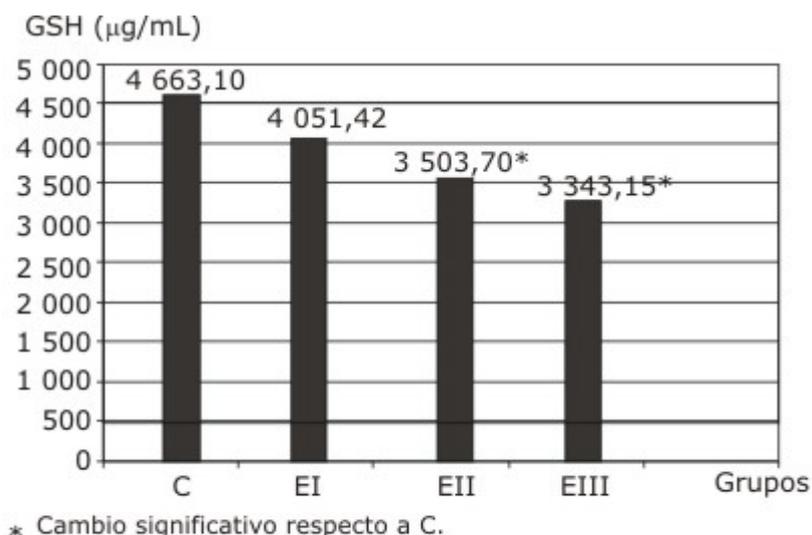


Fig. 4. Cambios en las concentraciones de glutatión a nivel renal en los grupos estudiados.

DISCUSIÓN

Brenner y otros² estudiaron los cambios hemodinámicos en los glomérulos remanentes de ratas Munich-Wistar después de nefrectomizado un riñón e infartado 5/6 partes del contralateral, los que han sido confirmados por estudios posteriores y se corroboran en esta investigación, donde se constataron 2 sem después de la nefrectomía, valores de intensidad de filtración glomerular y flujo plasmático renal efectivo, disminuidos respecto a las ratas sanas, aunque no al punto que debería esperarse si se considera que se les sustrajo a los animales 5/6 de la masa renal, lo que supone la intervención de mecanismos adaptativos. A medida que evolucionaron las ratas nefrectomizadas en el tiempo se produjo una caída de la función demostrada por la disminución de la IFG respecto a los controles, como era de esperar y ha sido reportado por otros autores.^{1,2}

Otros trabajos en el mismo modelo experimental han arrojado que el metabolismo de las nefronas residuales se incrementa notablemente, con un aumento del consumo de oxígeno y formación del radical oxígeno activado y se ha relacionado al estrés oxidativo con el deterioro funcional asociado a la ablación de masa renal y a la IRC.^{6,7,11,12} El modelo experimental ha sido ampliamente estudiado, sin embargo no se encontraron referencias de estudios secuenciales de marcadores de defensa antioxidante que ofrezcan información sobre los cambios que se van produciendo en el riñón remanente a medida que se modifica la función.

La superóxido dismutasa es una familia de enzimas que intervienen en la reducción univalente del radical superóxido. El incremento en la actividad superóxido dismutasa es exponente de una elevada generación de anión superóxido en la célula, que es eliminado por esta enzima.^{10,14} Se ha comprobado en estudios en laboratorio y en pacientes aquejados de enfermedades asociadas a estrés oxidativo, el aumento de los niveles de la enzima en respuesta a la generación excesiva de EROs.^{8,11,15} Según los resultados obtenidos en el presente estudio, hubo una depresión inicial de la actividad de la enzima, seguida de un aumento de ella, lo que coincide con los momentos de más significativos aumentos en la lipoperoxidación, que fueron ya corroborados en un estudio precedente en el mismo

modelo experimental a través de la cuantificación del malonildialdehído.⁷ La enzima constituye un mecanismo importante de defensa antioxidante pues atrapa EROs una vez formados impidiendo las reacciones radicales en cadena y su elevación se considera como un indicador indirecto importante de estrés oxidativo, aunque algunos autores no refieren variación en su actividad.^{10,12}

El glutatión reducido es una molécula que forma parte de los sistemas celulares no enzimáticos de defensa antioxidante, que atrapa radicales libres transformándose en GSSG (forma oxidada) en presencia la enzima glutatión peroxidasa, después el GSSG es reducido a GSH, en reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa. De esta forma son eliminadas especies reactivas del entorno celular.¹⁴ La disminución de los niveles de GSH se considera un indicador de estrés oxidativo y ha sido reportado por otros investigadores que lo han constatado en el modelo experimental de reducción de masa renal y en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal.^{16,17} La generación de EROs implica la utilización de las reservas antioxidantes con la consecuente disminución de los niveles circulantes de los mismos.^{8,18} En esta investigación se detectaron niveles cada vez más bajos de GSH a medida que progresaba la enfermedad en el tiempo, sugiriendo su consumo en respuesta al aumento cada vez mayor del daño oxidativo.

El análisis secuencial de los cambios en los indicadores de defensas antioxidantes estudiados sugiere que el estrés oxidativo en el riñón remanente aumenta, correlacionándose con la pérdida paulatina de la función renal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
2. Brenner BM, Rector FC (editors). The Kidney. Nephrology [CD-ROM]. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000.
3. Sheldin DW, Gusbech G. The kidney physiology and physiopathology. T 2. New York: Raven Press 1989. p. 1901-25.
4. Hernando Avedaño L, Aljans García P, Arias Rodríguez M, Caramelo Díaz C, Ejido de los Ríos J, Lamas Pérez S (editores). Nefrología clínica [CD-ROM]. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 1998.
5. Romero Elías MJ, Figueroa Marín H, Morales Segura MÁ, Rojas Rubio A. El estrés oxidativo en la pared vascular y su potencialidad de manipulación terapéutica. Rev Cubana Invest Bioméd [serie en Internet]. 2009 [citado 21 May 2010];28(3): [aprox. 49 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002009000300010&lng=es
6. Rodríguez Albanés A, Barranco Hernández E, Alonso Rodríguez CA, Soto Matos J. Comportamiento de la peroxidación lipídica en la insuficiencia renal crónica. Rev Cubana Invest Biomed [serie en Internet]. 2003 [citado 1 Dic 2004];22(1): [aprox. 7 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

7. Betancourt Valladares M, González de la Cruz YL, Vidor Guerra E, Miranda Naranjo M, Méndez MJ. Daño oxidativo a lípidos y proteínas en la insuficiencia renal crónica experimental. *Electron J Biomed*. 2007;3:18-28.
8. Implicancia de las especies reactivas del oxígeno en la insuficiencia renal crónica [en Internet]. 2001 [citado 21 Ene 2004]: [aprox. 6 p.]. Disponible en: <http://www.antioxidantes.com.ar/FrArt164.htm>
9. Chirino YI, Orozcolbarra M, Pedraza Chaverrí J. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Invest Clin*. 2006;58(4):350-8.
10. Céspedes EM, Reyes A. Marcadores de estrés oxidativo en ratas senescentes. *Rev Cubana Invest Biomed* [serie en Internet]. 2007 [citado 6 May 2010]; 26(2): [aprox. 12 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002007000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
11. González B. Progresión de la insuficiencia renal crónica y estrés oxidativo [en Internet]. 2001 [citado 21 Ago 2007]: [aprox. 17 p.]. Disponible en: <http://www.uninet.edu/cin2001/html/conf/basilia.html>
12. Betancourt Valladares M. Insuficiencia renal crónica experimental por nefrectomía sub-total y estrés oxidativo [trabajo para optar por el título de Especialista de I Grado en Fisiología Normal y Patológica]. Camagüey: Instituto Superior de Ciencias Médicas "Carlos Juan Finlay"; 2005.
13. Marklund S, Markund G. Involvement of de superoxide anion radical in autoxidation of Pyrogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1990;47:469-74.
14. Céspedes Miranda E, Ponte González G, Riverón Forment G, Castillo Herrera J. Marcadores de estrés oxidativo en pacientes hipertensos de una población rural en provincia Habana. *Rev Cubana Invest Bioméd* [serie en Internet]. 2008 [citado 1 Jun 2010];27(1): [aprox. 12 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002008000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
15. Cruz Manzano E, Espinosa Pérez D, Bahr Valcárcel P, Sanfiel Vasseur L. Marcadores bioquímicos del estrés oxidativo en pacientes hipertensos esenciales no tratados. *Rev Cubana Invest Bioméd* [serie en Internet]. 2007 [citado 2 Ago 2009]; 26(1): [aprox. 11 p.]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol26_3_07/ibi03307.html
16. Danuta Z, Wladyslaw G, Maria S, Irena M, Katarzyna K, Krystyna S. Oxidative stress in children on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2009;29(2):171-7.
17. Ahmadpoor P, Eftekhar E, Nourooz-Zadeh J, Servat H, Makhdoomi K, Ghafari A. Glutathione, glutathione-related enzymes, and total antioxidant capacity in patients on maintenance dialysis. *Iran J Kidney Dis*. Jan 2009;3(1):22-7.
18. Korish AA. Multiple antioxidants and L-Arginine modulate inflammation and dyslipidemia in chronic renal failure rats. *Ren Fail*. Jan 2010;32(2):203-13.

Recibido: 22 de julio de 2010.
Aprobado: 10 de agosto de 2010.

Dra. *Miriela Betancourt Valladares*. Facultad de Estomatología. Universidad de Ciencias Médicas. Carretera Central Oeste. Apartado 370. CP 70700 Camagüey 7, Cuba. Teléfono: 272602. Correo electrónico: mbetan@finlay.cmw.sld.cu