

Capacidad antioxidante en ratas diabéticas Rol de la vitamina E

Antioxidant ability in diabetic rats. Role of vitamin E

R. Oré, R. Valdivieso y D. Huerta *

RESUMEN

En el presente estudio se analizó el rol antioxidante de la vitamina E, administrada a ratas diabéticas, evaluando los cambios en la glicemia, hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), lipoperoxidación, antioxidantes totales, albúmina y proteínas totales.

Se trabajó con 4 grupos de animales de experimentación: I Control, II control más vitamina E (25 mg/día), III Diabético inducidos con estreptozotocina (35 mg/kg) y IV Diabético más vitamina E. Después de 8 semanas de tratamiento, con insulina 4 U/kg de peso observamos que en animales diabéticos con suplemento vitamínico mejora la glicemia y disminuyen los niveles de HbA_{1c}. En los grupos diabéticos y control que recibieron vitamina E disminuyen los niveles de lipoperoxidación en un 25%, comparados con los que no recibieron el suplemento.

Nuestros resultados sugieren que la vitamina E tiende a mejorar la glicemia, disminuir la HbA_{1c} y peroxidación lipídica y aumenta los antioxidantes totales en el grupo diabético.

Palabras clave: Diabetes, vitamina E, lipoperoxidación, hemoglobina glicosilada.

ABSTRACT

The antioxidant action of vitamin E was analyzed, the vitamin being administered to diabetic rats, and the changes in glycemia, glycosilated hemoglobin (HbA_{1c}) lipid peroxidation, total antioxidant, albumin and total proteins were evaluated.

Four groups of rats were employed: I control, II control plus vit E, III diabetics by streptozotocin, IV diabetic plus vit E.

After 8 weeks of treatment with insulin (4 U/Kg weight) diabetic animals dosed with vit E improved their glycemia and their HbA_{1c} level decreased. In diabetic and control groups that received vit E lipid peroxidation decreased 25%, compared with those who didn't receive the supplement.

These findings suggest that vit E tends to improve glycemia, decrease the HbA_{1c} levels and total antioxidants in diabetic groups.

Key words: Diabetic, vitamin E, lipid oxidation, hemoglobin glycosilation.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus agrupa un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por la hiperglicemia producida por falta de secreción de insulina, falta de acción de esta hormona o ambos mecanismos. Como consecuencia de la hiperglicemia crónica, se observa disfunción y lesión en diversos órganos, especialmente en ojos, riñón, nervios, corazón y vasos, complicaciones que producen una im-

portante alteración del estado de bienestar y una disminución de la esperanza de vida (Gonzales *et al.*, 1998 y Jam *et al.*, 1997).

Cada vez existen más evidencias que niveles altos de glucosa sanguínea favorecen la glicosilación no enzimática de las proteínas tisulares de larga duración, enzimas e incluso DNA (Daudona *et al.*, 1996); una de las proteínas que sufren esta glicosilación es la HbA_{1c}; esta hemoglobina sufre una serie de lentas redistribuciones químicas originando productos finales de glicosilación avanzada

* Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina. UNMSM

(PFGA), que suelen acumularse y que estarían involucrados en la generación de Radicales *Especies Reactivas derivadas del oxígeno (ROS)*.

Estos radicales pueden atacar los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados induciendo la lipoperoxidación, el cual puede producir un mayor daño celular oxidativo. Tales daños pueden ser prevenidos o moderados por un *sistema antioxidante*, que recogerían *ROS*.

Un *sistema antioxidante* depende primero de la presencia de elementos trazas como selenio, cobre, zinc y magnesio; segundo, de una adecuada concentración de vitamina E, C y Beta caroteno en el citoplasma y lípidos de la membrana de las células (Karasu *et al.*, 1997), Muliliky *et al.*, 1990 y Staht *et al.*, 1997). Debe señalarse que es muy difícil medir, *in vivo*, los niveles de radicales libres debido a su vida media corta, su gran reactividad y su baja concentración (Calderón, 2000). Así la medición de lipoperoxidación es un buen marcador para determinar el daño oxidativo de la célula, para lo cual se usan mediciones indirectas, tales como la formación de un complejo coloreado de TBA-MALONDIALDEHIDO (MDA).

El propósito del presente trabajo fue demostrar el rol antioxidante de la vitamina E administrada a ratas diabéticas, y observar si mejora sus defensas antioxidantes y su glicemia.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Material biológico

Se usaron 24 ratas machos Sprague-Dowley de un peso aproximado de 200-250 g, los cuales fueron colocados en jaulas individuales. Las condiciones ambientales fueron: temperatura promedio 22-25 °C y una humedad del 75% con un fotoperíodo de 12 horas.

Todos los animales fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud.

Los animales de experimentación fueron divididos en 4 grupos según dieta (6 ratas por grupo): I: Dieta control, II: Dieta control + vitamina E (900 mg/kg de dieta), III: Diabético, IV: Diabético + vitamina E.

Los animales recibieron una dieta isocalórica (433 Kcal) y agua *ad libitum* durante el experimento.

b. Método Analítico

1. INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL. Se produjo un estado diabético en ratas, en ayunas por administración intraperitoneal (ip.) de estreptozotocina (SZT) de 35 mg/kg de peso, la cual fue disuelta en *buffer* citrato pH 4,5 y utilizada dentro de los 10 minutos de su preparación (Karasu *et al.*, 1997).

Después de 8 semanas de tratamiento con insulina (4 U/kg de peso) por vía subcutánea, se consiguió un control metabólico más o menos estable en grupos diabéticos y en el que recibió vitamina E (25 mg/día).

2. DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DE GLUCOSA. Se usó el método espectrofotométrico de glucosa oxidasa-peroxidasa y las lecturas se realizaron a una longitud de onda 505 nm en el espectrofotómetro LKB asociado a una computadora (Valtek, 1998).

3. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA USANDO EL REFLOLUX. La glicemia se determinó en sangre total, tomado directamente de la cola. La gota de sangre se colocó en la tira reactiva de hemoglucotest y seguidamente se usó el equipo Reflolux de Boehringer.

4. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA_{1c}). Método de Cromatografía en columna de intercambio iónico; las lecturas fueron hechas a 415 nm (Biosystems, 1985).

Después de preparar un hemolizado, donde se elimina la fracción lábil, las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose de forma específica la hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) previa eliminación por lavado de la Hb_{ii+h}. La estimación del porcentaje de la HbA_{1c} se realiza por lectura de la absorción a 415 nm.

5. DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES TOTALES. Método Espectrofotométrico midiendo el radical catión ABTS⁺ (2,2'-Azino-di[3-etilbenotiazolin Sulfonato]). Este radical desarrolló un color verde azulado, midiéndose a 600 nm (Randox, 1998).

6. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO (MDA). Se determinó en suero fresco y según el método de Buege con algunas modificaciones (Suárez, 1995).

7. DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA Y PROTEÍNAS TOTALES. Se analizaron las muestras en el espectrofotómetro previa reacción con los reactivos de verde de Bromocresol para la albúmina y el Método de Biuret para las proteínas (Valtek, 1998).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Se reportaron los valores estadísticos como media, desviación estándar y la prueba significativa student para la diferencia de medias (Moya, 1988)

RESULTADOS

En la Tabla 1 presentamos los niveles de glicemia y de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) en las ratas según los grupos de tratamiento. Se observa una disminución en los grupos que recibieron el suplemento vitamínico al compararlos con sus respectivos grupos (control y diabético).

En el caso de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) existe diferencia significativa ($p < 0,05$) al comparar los grupos diabéticos.

Tabla N.º 1. Glicemia y hemoglobina glicosilada (% HbA1c) en ratas según dieta

Grupos	Glicemia (mg/%)	% HbA1C
Control	92,248 ± 11,72	4,67 ± 0,14
Control + Vit. E	79,000 ± 7,16	4,54 ± 0,16
Diabético	300,000 ± 41,63	6,08 ± 0,17 *
Diabético + Vit. E	257,830 ± 42,88	5,37 ± 0,40 *

* Diferencia significativa $p < 0,05$

El daño oxidativo (lipoperoxidación en suero) se determinó mediante el ensayo de la cuantificación del complejo Tiobarbitúrico-Malondialdehído (MDA), en el cual a menor concentración del metabolito mayor protección ante el daño oxidativo. En la Tabla 2 se reporta los niveles de MDA en suero, y se observa que los grupos que recibieron el suplemento vitamínico presentan menor daño oxidativo al compararlos con sus respectivos grupos que no recibieron la vitamina E.

Existe diferencia significativa ($p < 0,05$) al realizar las comparaciones en cualquiera de los grupos.

Tabla 2. Niveles de lipoperoxidación en suero (MDA) en ratas según dieta

Grupos	MDA ($\times 10^{-6}$ M)
Control	3,307 \pm 0,265 *
Control + Vit. E	2,653 \pm 0,198 *
Diabético	6,913 \pm 0,560 *
Diabético + Vit. E	5,371 \pm 0,484 *

* Diferencia significativa $p < 0,05$

El estado de antioxidantes totales (TAS) en suero se detalla en la Tabla 3 donde los grupos diabéticos presentan niveles de TAS ligeramente menores que los grupos control respectivos.

Sólo existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos: control y diabético.

Tabla 3. Antioxidantes totales (TAS) en suero en ratas según dieta

Grupos	TAS (m M)
Control	2,473 \pm 0,196 *
Control + Vit. E	2,300 \pm 0,184
Diabético	2,133 \pm 0,230 *
Diabético + Vit. E	2,282 \pm 0,183

* Diferencia significativa $p < 0,05$

En la Tabla 4 se detalla los niveles séricos de proteínas totales y de albúmina en ratas según el tipo de dieta, hallamos que los grupos control y diabético presentaron niveles de proteínas totales y albúmina ligeramente mayores a sus respectivos grupos que recibieron vitamina E. En proteínas totales existe diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 4. Niveles de proteínas y albúmina en suero en ratas según dieta

Grupos	Proteínas (g%)	Albúmina (g%)
Control	6,64 ± 0,531 ^{*a}	3,705 ± 0,296
Control + Vit. E	6,00 ± 0,480 [*]	3,290 ± 0,263
Diabético	5,82 ± 0,465	3,540 ± 0,283
Diabético + Vit. E	5,54 ± 0,443 ^a	3,330 ± 0,660

(* , ^a) Diferencia significativa $p < 0,05$

DISCUSIÓN

En la presente investigación, nosotros estudiamos si la administración de vitamina E (25 mg/día) a ratas diabéticas producía cambios metabólicos en la regulación de la glicemia y sus niveles antioxidantes.

Se ha observado que al administrar la vitamina antioxidante a los animales diabéticos hay una tendencia a mejorar la glicemia, sin llegar a una normoglicemia, y también a disminuir los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}). Esto nos induce a pensar el papel que cumple esta vitamina, probablemente disminuyendo la glicosilación de proteínas y por ende la generación de ROS.

Los indicadores utilizados para valorar el estrés oxidativo son muy diversos, y uno de los métodos más empleados consiste en medir los niveles de lipoperoxidación en el suero bajo la formación del complejo coloreado tiobarbitúrico-malondialdehído (TBA-MDA).

Los niveles de lipoperoxidación en el suero, al final del tratamiento, se encontraron incrementados en los grupos diabéticos y diabéticos con el suplemento vitamínico en un 100% al ser comparados con sus respectivos controles.

Sin embargo, al comparar los grupos que recibieron vitamina E (diabético y control) se observa una disminución de un 25% comparado con los que no recibieron el suplemento. Esta disminución puede deberse a que la vitamina E es el mejor sistema de neutralización de radicales libres, siendo muy efectiva para prevenir la lesión causada por los mismos a nivel de las membranas celulares.

Al valorar antioxidantes totales en suero, se observó una tendencia a mejorar los niveles en los grupos que recibieron el suplemento vitamínico, sin llegar a ser significativo.

En relación a la albúmina y proteínas en los animales diabéticos, estos fueron menores

al compararlos con los controles respectivos: se presume que la generación de radicales libres tienden a oxidar a la albúmina y proteínas, motivo por el cual los niveles fueron ligeramente menores.

Bonet *et al.* (1998) administraron vitamina E a grupos de ratas gestantes diabéticas tratadas con dosis bajas (25 y 50 mg/día) y encontraron que no era efectiva para reducir la tasa de malformaciones en la gestación (21 días); sin embargo si ésta se incrementa a (500 mg/día), la incidencia de absorciones embrionarias se elevaba.

En nuestra investigación la dosis administrada fue de 25 mg/día, y se pudo observar una ligera mejora en el sistema de antioxidantes y en la lipoperoxidación, lo que podría explicarse debido al tiempo que duró el experimento a pesar de que la dosis fue baja. Es probable que la administración de dosis bajas de esta vitamina por un tiempo mas prolongado permita mejorar las defensas antioxidantes.

Estos hallazgos sugieren que la vitamina E tiende a normalizar la hiperglicemia, hemoglobina glicosilada, peroxidación lipídica y los antioxidantes totales.

CONCLUSIONES

1. Los niveles de HbA_{1c} presentan una relación directa con los niveles de lipoperoxidación en suero.
2. Los niveles de lipoperoxidación disminuyen cerca de un 25% en animales que recibieron vitamina E.
3. La vitamina E mejora los antioxidantes totales en animales diabéticos.

LITERATURA CITADA

- Biosystems. Manual de técnicas. 1985. Biosystems Bisse E. Abraham Ec. J. Chromatog, 344: 81-91.
- Bonet, B. S., M. Viana y E. Herrera. 1998. Efectos teratogénicos de la diabetes: papel de los radicales libres. *Endocrinología* 45(8): 32-37.
- Calderón, R. 2000. Observaciones sobre diabetes mellitus al fin del milenio. *Diagnóstico* 39(1): 6-17
- Daudona, P. y K. Thusu. 1996. Lesión oxidativa del ADN en la diabetes mellitus 1996. *The Lancet* 29(1).
- González S., J. L. Herrera P, J. F. Ascaso, F. Escobar J., J. A. Gómez G., J.A. Jimenez Pere-Perez, Rosell y J. Rubies-Prat. 1998. Dislipidemia diabética: documento de consenso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis y la Sociedad Española de la diabetes. *Endocrinología*, Vol. 45, N.º 4, 49-56.
- Jam, S. K., y M. Palmer. 1997. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E and glycosylation of proteins. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 22 (4): 593-596.
- Karasu, C., G. Osandy, D. Bozkurt, D. Erogan and S. Omerglu. 1997. Antioxidant and triglyceride, lowering effects of vitamin E associated with the prevention of abnormalities in the reactivity and morphology of aorte from streptozotocin diabetic rats. Antioxidants in diabetes complications. *Metabolism*. 46 (8): 872-879.

- Moya, R. y A. Saravia. 1988. Probabilidad e Inferencia Estadística, 2.^a edición.
- Mulilirkey, C., J. Edelstein, y D. Browler. 1990. Free radical generation by early glycation. products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Research Commun* 31: 173 (3) 932-939.
- Nyark, A., K. Siftie y A. Addy. 1993. The basis of the antihyperglycemic activity of *Indifore anecta* in rat. *Phytoterapy research* 7:1-4.
- Randox Laboratories. 1998. 70 Norman Street, Suite 3.^a San Francisco, CAA. 94124.
- Staht *et al.* 1997. Antioxidant defense: Vitamina E, and C and carotenoids. *Diabets* 46 (2): 514-518.
- Suárez C, S. 1995. *Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios en ratas*. Tesis de Maestría en Bioquímica UNMSM.
- Valtek. *Manual de técnicas*. 1998. Reactivos Valtek para diagnóstico clínico. Santiago, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Por su colaboración logística a la Sra. Vilma Cabezas Arroyo y a la Srta. QF Rosa Oriondo Gates.