



## Efecto de la vitamina E sobre antioxidantes endógenos en ratas Wistar diabéticas

### Effect of Vitamin E on endogenous antioxidants in diabetic Wistar rats

**Ariel Montier Iglesias,<sup>1</sup> Ildelfonso Cabezas Alfonso,<sup>2</sup> José Caridad Díaz Cabrera,<sup>3</sup> Elisa Maritza Linares Guerra,<sup>4</sup> Everaldo Jerez Hernández<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Médico. Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral y en Bioquímica Clínica. Profesor Asistente. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Facultad de Ciencias Médicas Ernesto che Guevara de la Serna. Pinar del Río. Cuba. montieriglesias@infomed.sld.cu

<sup>2</sup> Médico Veterinario. Profesor Consultante.

<sup>3</sup> Médico. Especialista de Primer Grado en Bioquímica Clínica. Máster en Educación Médica Superior. Profesor Auxiliar. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Facultad de Ciencias Médicas Ernesto che Guevara de la Serna. Pinar del Río. Cuba. josecaridad@infomed.sld.cu

<sup>4</sup> Licenciada en Bioquímica. Máster en Bioquímica. Doctor en Ciencias de la Salud. Profesora Titular. Universidad de Pinar del Río. Hermanos Saiz Montes de Oca. Pinar del Río. Cuba. maritza.linares@upr.edu.cu

<sup>5</sup> Licenciado en Bioquímica. Profesor Auxiliar. Máster en Enfermedades Infecciosas. Hospital General Docente Abel Santamaría Cuadrado. Pinar del Río. Cuba. jerezale@infomed.sld.cu

**Recibido:** 01 de febrero de 2018

**Aprobado:** 06 de abril de 2018

## RESUMEN

**Introducción:** la Diabetes Mellitus es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más frecuentes del mundo, la cuarta o quinta causa de muerte en la mayoría de los países de ingresos altos. La Organización Mundial de la Salud reportó en el 2014 una prevalencia de **422** millones de diabéticos en todo el mundo.

**Objetivo:** evaluar el efecto de la vitamina E sobre antioxidantes nucleofílicos endógenos, en un biomodelo de diabetes mellitus inducida por estreptozotocina.

**Métodos:** se utilizaron 40 ratas Wistar machos distribuidas en cuatro grupos de 10 ratas cada uno: control no diabético, control diabético, y dos grupos diabéticos que recibieron suplementación con dosis de 25 y 50 mg/kg/día de vitamina E, respectivamente. Se determinaron en todos los animales los valores séricos de glucosa, albúmina, ácido úrico y bilirrubina total en intervalos de 15 días durante un mes. Se utilizaron las pruebas U de Mann-Whitney y Wilcoxon con un nivel de significación del 5 %, para la comparación de los valores centrales de las variables bioquímicas entre los grupos de ratas.

**Resultados:** con la suplementación de la vitamina E en las ratas diabéticas no se encontró variación de la albúmina sérica (medianas en g/L 36,70 y 36,40), mientras que el ácido úrico (medianas en mmol/L 76,50 y 187,5) y la BT (mediana en mmol/L 2,90 y 5,00) disminuyeron significativamente, independientemente de la dosis del antioxidante. La reducción del ácido úrico resultó más rápida y a menor dosis que la BT.

**Conclusiones:** la suplementación con vitamina E en el modelo experimental de diabetes mellitus reduce los niveles séricos de antioxidantes nucleofílicos que en altas concentraciones representan riesgo de procesos mórbidos asociados a daño tisular.

**DeCS:** DIABETES MELLITUS; VITAMINA E; ALBÚMINA; ÁCIDO ÚRICO; BILIRRUBINA.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Diabetes Mellitus is one of the most common chronic noncommunicable diseases in the world, the fourth or fifth cause of death in most high-income countries. The World Health Organization reported in 2014 a prevalence of 422 million diabetics worldwide.

**Objective:** to assess the effect of vitamin E on endogenous nucleophilic antioxidants in a biomodel of streptozotocin-induced diabetes mellitus.

**Methods:** 40 male Wistar rats were used in four groups of 10 rats each: non-diabetic control, diabetic control, and two diabetic groups that received supplementation with doses of 25 and 50 mg / kg / day of vitamin E, respectively. Serum values of glucose, albumin, uric acid and total bilirubin were determined in all animals at 15-day intervals for one month. The U-tests of Mann-Whitney and Wilcoxon with a significance level of 5% were used to compare the central values of the biochemical variables between the groups of rats.

**Results:** with vitamin E supplementation in diabetic rats, no variation of serum albumin was found (median in g / L 36,70 and 36,40), while uric acid (median in mmol / L 76, 50 and 187.5) and BT (median in mmol / L 2.90 and 5.00) decreased significantly, regardless of the antioxidant dose. The reduction of uric acid was faster and at a lower dose than BT.

**Conclusions:** supplementation with vitamin E in the experimental model of diabetes mellitus, reduces serum levels of nucleophilic antioxidants, which at high concentrations represent a risk of morbid processes associated with tissue damage.

**DeCS:** DIABETES MELLITUS; VITAMIN E; ALBUMINS; URIC ACID; BILIRUBIN.

---

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más frecuentes del mundo, la cuarta o quinta causa de muerte en la mayoría de los países de ingresos altos, aunque representa también una epidemia creciente en los países de ingresos medios y bajos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el 2014 una prevalencia de 422 millones de diabéticos en todo el mundo, lo que constituye uno de los problemas sanitarios más exigentes del siglo XXI. Cuba no escapa de esa tendencia, y en la última década se duplicaron los enfermos, que en 2013 superaron los 570 mil casos. En la Provincia Pinar del Río específicamente se estima que a finales de 2016 existían más de 40 mil pacientes, lo que representaba el 6,3 % de la población local, con incremento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en personas jóvenes (enfermedad anteriormente asociada a personas mayores de 60 años), según información aportada por el Centro Provincial de Atención Integral al Diabético.

En la patogenia de las complicaciones y daños de la DM se ha demostrado que juega un papel primordial el estrés oxidativo, debido a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y debilitamiento de las defensas antioxidantes responsables de la eliminación de los radicales libres, efectos que son más evidentes en esta entidad. <sup>(1,2,3)</sup>

Las defensas antioxidantes se ven alteradas por la disminución de la concentración de vitamina C en los glóbulos blancos, de la cantidad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GP), en glóbulos rojos y blancos, y de la vitamina E en el plasma.<sup>(4)</sup>

Son reducidos los estudios que hacen énfasis en el papel de la albúmina, el ácido úrico y la bilirrubina, en el sistema amortiguador antioxidante global en la condición de estrés de la DM2. Por otra parte, algunos resultados sugieren que la suplementación con vitamina E tiende a mejorar la glucemia, disminuir la hemoglobina glucosilada (HbA1c), la peroxidación lipídica y a aumentar la capacidad antioxidante total en los diabéticos; <sup>(5,6)</sup> además ha quedado demostrado que el tratamiento con vitamina E tiene efectos beneficiosos en la protección frente a complicaciones vasculares de pacientes diabéticos. Sin embargo, no se encuentran en la literatura científica reportes sobre el efecto de la administración de vitamina E en los niveles séricos de estos tres antioxidantes endógenos nucleofílicos (albúmina, el ácido úrico y la bilirrubina).

A diferencia de los antioxidantes endógenos, los antioxidantes exógenos son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares, impidiendo la lipoperoxilación. En este grupo se encuentra la vitamina E, que se incluye entre los agentes de mayor actividad antioxidante, pues suprime daños oxidativos en membranas, lipoproteínas y tejidos mediante su grupo hidroxilo (-OH) fenólico, que es capaz de neutralizar el oxígeno simple

( $^1\text{O}_2$ ), capturar radicales libre hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) y aniones superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y neutralizar peroxilos. <sup>(7)</sup>

La gravedad de este problema de salud y el desconocimiento que aún persiste sobre los mecanismos patogénicos de la DM exige de estudios rigurosos para garantizar avances en la prevención y tratamiento de la misma, lo que dependerá en gran parte de la comprensión de estos mecanismos, para lo cual es imprescindible utilizar modelos animales en los que se pueden realizar experimentos que serían éticamente inaceptables en humanos.

En especial, el uso de biomodelos para el estudio de enfermedades como la DM ha jugado un papel importante para entender la patogenia de la misma, y han sido de gran valor para la proyección y evaluación de regímenes de tratamiento. Lo anterior sirvió de motivación en el diseño de la presente investigación con el propósito de evaluar los efectos de la vitamina E sobre los niveles de antioxidantes endógenos nucleofílicos en un modelo experimental de diabetes mellitus inducido por STZ en ratas Wistar machos jóvenes.

## MÉTODO

**Diseño de la Investigación:** Se realizó un estudio experimental en la Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río, Cuba, durante el período comprendido del día 07 de marzo y el 05 de abril de 2016.

### Desarrollo del biomodelo

- **Animales de experimentación**

Se emplearon 40 ratas machos Wistar, clínicamente sanos y libres de gérmenes patógenos específicos (SPF).

- **Condiciones de mantenimiento de los animales de experimentación**

A los animales se les suministró agua hervida en biberones de policarbonato de 500 ml, con pipeta de acero inoxidable, y se alimentaron con pienso ratonina del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Todos estos materiales fueron esterilizados mediante autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos y suministrados a voluntad (*ad libitum*). Las ratas del ensayo se mantuvieron bajo condiciones estándar de foto período (12h luz/12h oscuridad) y a temperatura ambiental.

Durante todo el estudio se realizaron observaciones diarias que permitieron dar seguimiento al estado general de las ratas y al mantenimiento de las condiciones necesarias para el desarrollo del experimento.

- **Biomodelo de diabetes mellitus tipo 2**

Para la obtención del biomodelo, en un primer momento, las ratas se distribuyeron en dos grupos: el control no diabético, conformado por las ratas de la uno a la 10 (10 animales), que no recibió tratamiento con estreptozotocina (STZ) y el grupo expuesto a la STZ (que posteriormente resultó grupo diabético), con las ratas del 11 al 40 (30 animales). Estas ratas recibieron la STZ por vía intraperitoneal (ip) en dosis única de 60mg/kg de peso corporal, que se encuentra en el rango de las dosis más empleadas para la producción de la condición similar a la DM2.

Las ratas fueron distribuidas en cuatro grupos, cada uno de ellos con 10 animales. Los grupos se nombraron: control no diabético, control diabético, y dos grupos experimentales diabéticos que recibieron suplementación con dosis de 25 y 50 mg/kg de vitamina E respectivamente.

### **Determinaciones bioquímicas**

A todas las ratas diabéticas del experimento se les realizó medición de glucemia (por el método de la glucosa oxidasa), albúmina (por el método del Verde Bromocresol), ácido úrico (por método enzimático colorimétrico) y bilirrubina (por método enzimático colorimétrico) cada 15 días por un mes.

- Glucemia
- Albúmina sérica
- Ácido úrico
- Bilirrubina total

Considerando la no homogeneidad de criterios sobre los valores de referencia de glucemia, albúmina, ácido úrico y bilirrubina total en ratas Wistar, se procedió a encontrar valores de referencia propios, realizando esas determinaciones en las 10 ratas pertenecientes al grupo control no diabético. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Glucemia:  $5,57 \pm 0,50$  mmol/L.
- Albúmina:  $35,84 \pm 2,13$  g/L.
- Ácido úrico:  $76,50 \pm 4,77$   $\mu$ mol/L.
- Bilirrubina total:  $2,87 \pm 0,73$   $\mu$ mol/L.

Estas cifras se encuentran en el rango de valores de referencia reportados por varios investigadores. <sup>(8)</sup>

Criterio para el diagnóstico de la diabetes mellitus en las ratas Wistar

Glucemia después de 8 hrs de ayuno, superior a 11.11 mmol/L, similar al empleado por otros estudios previos y que coincide con el criterio diagnóstico de la diabetes mellitus en humanos para la glucemia al azar y la postprandial de dos horas de sobrecarga oral de glucosa.

Desarrollo del experimento La glucemia en las ratas sometidas al tratamiento con STZ se determinó antes de comenzar el ensayo y a las 24 horas de administrada la STZ, para identificar el momento en que se produjo el aumento y establecer la latencia en la aparición de la enfermedad (valores de glucemias mayores a 11.11 mmol/L). A las 24 horas, una vez que se comprobó que las ratas desarrollaron la diabetes mellitus, se inició el experimento con la administración de las dosis de vitamina E, constituyendo el tiempo cero de la toma de muestra para el ensayo de suplementación en los dos grupos diabéticos.

Al grupo control no diabético (10 animales) no se le administró vitamina E y el resto de los animales diabético se distribuyeron al azar en tres grupos de 10 ratas cada uno: un grupo control diabético, que no recibió tratamiento con vitamina E y dos grupos experimentales diabéticos, a los que se les administraron dosis de 25 y 50mg/kg/días respectivamente durante un periodo de 30 días. La administración de la vitamina E se realizó vía oral directa por cánula.

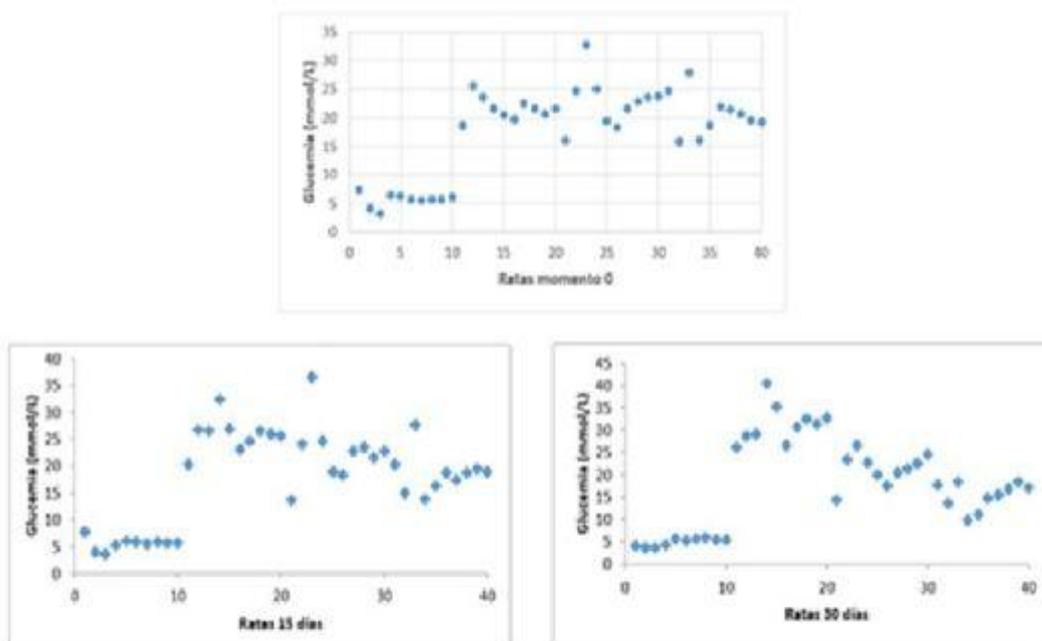
La glucemia, la albúmina, el ácido úrico y la bilirrubina se determinaron durante la fase experimental del ensayo a las 24 horas de administrada la STZ (tiempo cero), y luego de administrada la vitamina E a los 15 y 30 días.

## Procesamiento estadístico.

Los datos de las diferentes variables bioquímicas obtenidas en el suero de las ratas se almacenaron en una hoja de cálculo Microsoft Excel 2013, para su posterior procesamiento en el paquete estadístico SPSS versión 20. Para comprobar el supuesto de normalidad en cada una de las variables cuantitativas, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para muestras pequeñas ( $n < 50$ ), comprobándose la falta de normalidad. El análisis descriptivo de los datos se basó en la obtención de medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar). Para comparar los valores centrales de las variables cuantitativas en los diferentes grupos de estudio, se aplicaron las pruebas no paramétricas U de Mann Whitney para dos muestras independientes, y la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas. En todas las pruebas estadísticas se fijó un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

Los valores individuales de glucemia de todas las ratas utilizadas en el estudio durante el tiempo de duración del mismo. Se observa que las del grupo control no diabético (1-10), no tratadas con STZ, mantuvieron la glucemia en el rango de referencia establecido (5,58-7,57 mmol/L), por su parte, el 100 % de las tratadas con dosis única de 60 mg/kg de STZ (11-40), alcanzaron valores por encima de 11,1 mmol/L a las 24 horas posterior al tratamiento (tiempo cero)(Fig. 1).



**Fig. 1** Valores individuales de glucemia (mmol/L) en todos los grupos de ratas Wistar en los tres momentos del estudio.  
Ratas 1-10: Grupo control no diabético (no tratados con estreptozotocina).  
Ratas 11-40: Grupo tratados con estreptozotocina.

Los valores centrales (media y mediana) de los niveles séricos de antioxidantes endógenos nucleofílicos (albúmina, ácido úrico y bilirrubina total) en las 10 ratas Wistar machos del grupo control no diabético (no tratadas con STZ) y de las 30 ratas con diabetes inducida con STZ (tabla 1).

**Tabla 1.** Variación de los niveles séricos de antioxidantes endógenos en ratas Wistar machos con diabetes mellitus inducida con estreptozotocina, a las 24 horas del tratamiento.

Grupo	Antioxidantes endógenos Media $\pm$ DE (mediana)		
	Albúmina (g/L)	Ácido úrico ( $\mu$ mol/L)	Bilirrubina Total ( $\mu$ mol/L)
Control no diabético	36,39 $\pm$ 1,87 (36,70)	76,50 $\pm$ 6,21 (76,50)	2,82 $\pm$ 0,98 (2,90)
Grupo de ratas tratadas con estreptozotocina	36,29 $\pm$ 2,05 (36,40)	189,00 $\pm$ 7,45 (187,5)	5,45 $\pm$ 2,01 (5,00)
U de Mann Whitney	146,00	300,00	276,00
p	P>0.05	P<0,001	P<0,001

Se encontró un aumento significativo del ácido úrico y la bilirrubina total en las ratas diabéticas a las 24 horas del tratamiento, con relación a las ratas del grupo control. Para ambas variables bioquímicas la comparación resultó con significación estadística ( $p < 0,001$ ) al aplicar la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para dos muestras independientes. Por otra parte, los niveles séricos de albúmina fueron similares en ambos grupos ( $p > 0,05$ ).

Los niveles séricos de antioxidantes endógenos nucleofílicos en los grupos control diabético y diabéticos suplementados con vitamina E (tabla 2).

**Tabla 2.** Niveles séricos de antioxidantes endógenos en ratas Wistar con Diabetes mellitus inducida por estreptozotocina, a los 15 y 30 días de suplementación con vitamina E.

Grupos	Antioxidantes Endógenos media $\pm$ DE (mediana)					
	Albúmina (g/L)		Ácido úrico ( $\mu$ mol/L)		Bilirrubina total ( $\mu$ mol/L)	
	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días
Control diabético (sin vitamina E)	37,26 $\pm$ 2,18 (38,20)	36,70 $\pm$ 2,53 (36,40)	201,80 $\pm$ 5,12 (201,00)	229,80 $\pm$ 6,07 (231,50)	5,83 $\pm$ 2,49 (5,30)	6,59 $\pm$ 2,27 (6,00)
Grupos experimentales (con vitamina E)	36,45 $\pm$ 1,86 (36,15)	37,24 $\pm$ 1,77 (37,65)	135,75 $\pm$ 9,92 (137,5)	110,65 $\pm$ 12,27 (111,0)	4,14 $\pm$ 0,48 (4,35)	3,34 $\pm$ 0,40 (3,50)
U de Mann Whitney	76,00	112,5	0,00	0,00	30,5	0,00
p	0,31	0,58	<0,001	<0,001	0,002	<0,001

Los resultados corresponden a los 15 y 30 días de suplementación. Tanto el ácido úrico como la bilirrubina total disminuyeron significativamente en las ratas suplementadas, en comparación con el control diabético ( $p < 0,01$  en todas las comparaciones al realizar la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes). Este resultado fue válido tanto a los 15 como a los 30 días de la administración de la vitamina E. Por su parte, los niveles séricos de albúmina fueron similares en ambos grupos ( $p > 0,05$ ), es decir en el control diabético (no suplementado) y en el grupo diabético suplementado con vitamina E.

Los valores centrales del ácido úrico y bilirrubina total, correspondientes a los dos grupos diabéticos suplementados con vitamina E: el grupo diabético con 25 mg/día y con 50 mg/día, durante un período de tiempo de 15 y 30 días de suplementación. (tabla 3)

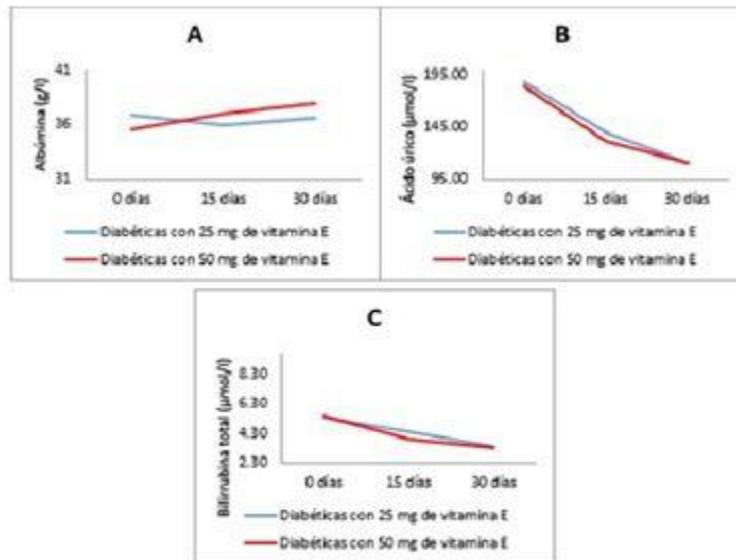
**Tabla 3.** Efecto de la dosis de vitamina E sobre los niveles séricos de antioxidantes endógenos en el biomodelo químico de diabetes mellitus inducida por estreptozotocina en ratas Wistar machos.

Grupos	Antioxidantes Endógenos media $\pm$ DE (mediana)					
	Albúmina (g/L)		Ácido úrico ( $\mu$ mol/L)		Bilirrubina total ( $\mu$ mol/L)	
	15 días	30 días	15 días	30 días	15 días	30 días
Diabéticos con 25 mg de vitamina E	35,89 $\pm$ 1,53 (36,10)	36,60 $\pm$ 2,10 (36,85)	139,60 $\pm$ 12,09 (142,50)	110,50 $\pm$ 14,42 (105,50)	4,37 $\pm$ 0,30 (4,50)	3,43 $\pm$ 0,31 (3,50)
Diabéticos con 50 mg de vitamina E	37,01 $\pm$ 2,08 (37,10)	37,88 $\pm$ 1,15 (38,30)	131,90 $\pm$ 5,36 (130,00)	110,80 $\pm$ 10,48 (112,50)	3,92 $\pm$ 0,54 (3,75)	3,26 $\pm$ 0,47 (3,40)
U de Mann Whitney	67,5	70,0	16,0	50,5	28,5	40,0
p	0,190	0,143	<b>0,009</b>	>0.05	0,105	0,481

Los niveles séricos de albúmina obtenidos en las ratas suplementadas fueron independientes de la dosis de la vitamina E, ya que los valores medios encontrados fueron similares en el grupo diabético con 25 mg/día y el grupo diabético con 50 mg/día ( $p > 0,05$  por U de Mann Whitney), en los dos momentos del experimento (15 y 30 días).

En el caso específico del ácido úrico, si bien a los 30 días de suplementación con la vitamina E sus niveles séricos resultaron independientes de la dosis, a los 15 días la dosis de 50 mg/día provocó una disminución significativa del ácido úrico sérico en el grupo de ratas que lo recibieron, con relación a las ratas suplementadas con la mitad de esta dosis ( $p < 0,001$  por U de Mann Whitney).

El efecto del tiempo de suplementación con dosis de 25 y 50 mg/día de vitamina E sobre los niveles séricos de la albúmina, el ácido úrico y la bilirrubina, en las ratas Wistar con diabetes química. (fig. 2)



**Fig. 2** Efecto del tiempo de suplementación con vitamina E sobre los niveles séricos de albúmina (A), ácido úrico (B) y bilirrubina total (C) en ratas Wistar con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina.

Con la dosis de 25 mg/día de vitamina E la albúmina no experimentó cambios en sus niveles séricos durante todo el tiempo que duró el experimento (Día cero:  $36,91 \pm 1,93$ , mediana= 36,85; Día 15:  $35,89 \pm 1,53$ , mediana=36,10; Día 30:  $36,60 \pm 2,10$ , mediana= 36,85; Comparaciones: 0 y 15 días:  $p=0,355$ ; 0 y 30 días:  $p=0,943$ ; 15 y 30 días:  $p= 0,341$ ); sin embargo, con el doble de la dosis (50 mg), se observó un aumento significativo a los 30 días de suplementación, con relación al tiempo cero. (Día cero:  $35,57 \pm 2,02$ , mediana= 35,90; Día 15:  $35,01 \pm 2,08$ , mediana= 37,10; Día 30:  $37,88 \pm 1,15$ , mediana= 38,30; Comparaciones: 0 y 15 días:  $p= 0,094$ ; 0 y 30 días:  $p= 0,035$ ; 15 y 30 días:  $p= 0,258$ ).

La disminución significativa del ácido úrico se evidenció durante todo el tiempo del estudio, es decir, a los 15 y 30 días de suplementación con vitamina E, con respecto al tiempo cero, y a los 30 días con respecto a los 15 días, independientemente de la dosis utilizada con suplementación de 25 mg de vitamina E (Día cero:  $188,3 \pm 6,41$ , mediana= 187,50; Día 15:  $139,60 \pm 12,09$ , mediana= 142,50; Día 30:  $110,50 \pm 14,42$ , mediana= 105,50; Comparaciones: 0 y 15 días:  $p= 0,005$ ; 0 y 30 días:  $p= 0,005$ ; 15 y 30 días:  $p= 0,005$ ), y con suplementación de 50 mg de vitamina E (Día cero:  $184,9 \pm 4,79$ , mediana= 4,79; Día 15:  $131,90 \pm 5,36$ , mediana=130,00; Día 30:  $110,80 \pm 10,48$ , mediana= 112,50; Comparaciones: 0 y 15 días:  $p= 0,005$ ; 0 y 30 días:  $p= 0,005$ ; 15 y 30 días:  $p= 0,005$ ).

Para la bilirrubina total se observó que si bien con una dosis de 50 mg/día de vitamina E la disminución fue significativa durante todo el tiempo del experimento (Día cero:  $5,47 \pm 1,88$ , mediana= 5,20; Día 15:  $3,92 \pm 0,54$ , mediana= 3,75; Día 30:  $3,26 \pm 0,47$ , mediana= 3,40; Comparaciones: 0 y 15 días:  $p= 0,048$ ; 0 y 30 días:  $p= 0,017$ ; 15 y 30 días:  $p= 0,034$ ), al utilizar la mitad de esta dosis solo se encontró una disminución de la bilirrubina total con significación estadística a los 30 días de suplementación, con respecto al tiempo cero (Día cero:  $5,39 \pm 1,95$ , mediana= 5,05; Día 15:  $4,37 \pm 0,30$ , mediana= 4,50; Día 30:  $3,43 \pm 0,31$ , mediana= 3,50; Comparaciones: 0 y 15 días:  $p= 0,094$ ; 0 y 30 días:  $p= 0,035$ ; 15 y 30 días:  $p= 0,258$ ), es decir, la dosis más pequeña evaluada requirió un mayor tiempo para provocar una disminución significativa de la bilirrubina total, de manera que para un mismo tiempo de suplementación la disminución de la bilirrubina resultó independiente de la dosis.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio la respuesta con relación a los niveles séricos de glucosa de las ratas tratadas con STZ coincide con lo reportado por otros investigadores que utilizaron el mismo modelo para la inducción química de la diabetes. <sup>(9)</sup> Por su parte Amaya-Chávez encontró el debut de la enfermedad en un tiempo de dos a cuatro semanas, ya que en su modelo combinó la STZ con nicotinamida (225 mg/kg), vitamina que ejerce un efecto protector sobre las células  $\beta$ .

La STZ es una nitrosourea que contiene un componente estructural semejante a la glucosa, por lo cual reconoce a los transportadores de glucosa GLUT2, provoca disminución en la expresión de estos, así como destrucción de un importante número de células  $\beta$  del páncreas por toxicidad directa en el ADN a dosis alta única (60 mg/kg de peso), en un tiempo breve, de solo 24 horas, por lo que desencadena un estado similar a la DM. <sup>(9)</sup>

En la presente investigación las cifras de glucemia en las ratas diabéticas se mantuvieron elevadas durante todo el tiempo del estudio (por encima de 11,1 mmol/l), por lo cual el biomodelo de diabetes mellitus que se obtuvo fue estable, al menos en el tiempo en que duró el experimento (cuatro semanas), por lo cual se infiere que se provocó en todas las ratas tratadas la destrucción de células  $\beta$  en los islotes pancreáticos, en respuesta a los radicales libres generados por la acción de la STZ, tal y como plantea la "hipótesis de Okamoto".

Se ha planteado que la elevación de los niveles de ácido úrico en los pacientes diabéticos con resistencia a la insulina, y por tanto, con un aumento en sangre de esta hormona, responde a un incremento en la reabsorción de ácido úrico en el túbulo renal, y consecuentemente a una reducción de su eliminación. Los resultados encontrados en este experimento sugieren la existencia de otros factores que contribuyen a la hiperuricemia en el diabético. Teniendo en cuenta el mecanismo de acción de la STZ sobre las células  $\beta$  del páncreas, es probable que, debido al daño celular, se produjera un aumento en la degradación de los nucleótidos purínicos, y por tanto, del producto final de su catabolismo.

Se reportan varios factores que pueden intervenir en la tendencia al aumento de los valores de ácido úrico en la diabetes. La activación de mediadores proinflamatorios (IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ ) por las especies reactivas generadas por la glucosilación no enzimática de proteínas y las propias EROs inducen la síntesis de la enzima de membrana XO, favoreciendo la formación de ácido úrico. <sup>(9,10)</sup> También los propios radicales libres y las EROs aumentan la oxidación del ascorbato, disminuyendo su disponibilidad y su efecto uricosúrico. <sup>(10)</sup>

La disminución de los valores de vitamina E en el diabético que aminora el efecto de esta en la reducción de los niveles séricos de ácido úrico y la disminución de la vida media de la hemoglobina que producto de su glucosilación pudiera determinar una mayor disponibilidad de ácido úrico al disminuir su utilización en la reducción del oxidante oxo-hemo formado por la reacción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con la hemoglobina. <sup>(6,11)</sup>

El aumento del metabolismo del grupo hemoproducto del catabolismo de la hemoglobina, y por la degradación de otras hemoproteínas intracelulares provenientes de las células dañadas, conlleva una mayor producción de bilirrubina elevando sus niveles séricos como se evidencia en la tabla 2, lo que está en concordancia con otros estudios realizados en animales y humanos.

Se conoce que la STZ compite con la glucosa por el GLUT2 y disminuye su expresión y la síntesis de insulina, por lo que, similar a lo que ocurre en la DM2 en humanos, de forma general se afecta el mecanismo de acción de esta hormona, lo que justificaría una menor disponibilidad de glucosa en el interior del hepatocito, y a consecuencia de ello, una disminución del glucuronato ( $C_6H_9O_7^-$ ) derivado de este monosacárido, que por acción de la

glucoroniltransferasa se conjuga en el hígado con la bilirrubina.<sup>(9)</sup> El déficit del glucuronato en el hígado produciría un aumento de la BT a expensas de la bilirrubina indirecta.

La no modificación de los valores de albúminas en ratas diabéticas coincide con los resultados obtenidos por Oré en un modelo de DM1 en ratas Sprague-Dowley machos, pues no se produce toxicidad hepática por la STZ, fármaco al que se le reconoce su selectividad por las células  $\beta$ .<sup>(9)</sup> Es conocido también que algunos de los mediadores proinflamatorios generados como consecuencia de la glucosilación no enzimática estimulan en el hígado de forma selectiva la síntesis de algunas proteínas de fase aguda (fibrinógeno, la proteína C reactiva, la haptoglobina y proteínas con actividad antiproteásica) sin afectar la síntesis de otras como la albúmina.

La hiperglucemia que se produce en la DM facilita la glucosilación de la albúmina, y esta, una vez glucosilada, aumenta la producción de EROs en el endotelio, mediante la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células  $\beta$  activadas (NF- $\kappa\beta$ ) y el desacoplamiento de la sintasa óxido nítrico endotelial (NOSe), lo que contribuye al estrés oxidativo.

Por otra parte, la afectación del mecanismo de acción de la insulina disminuye su efecto estimulador de la síntesis de proteínas y por tanto de la albúmina.

Los cambios en el ácido úrico coinciden con los resultados de Kristoffer en humanos. La acción antioxidante del grupo hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) fenólico de la vitamina E es capaz de neutralizar el oxígeno simple ( $^1\text{O}_2$ ), capturar radicales libres hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), aniones superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), y neutralizar peróxidos; además bloquea la unión de los grupos aminos libres con el carbonilo de la glucosa, disminuyendo la glucosilación no enzimática de proteínas y con esto la generación de EROs, lo que disminuye el efecto inductor sobre la XO por los mediadores proinflamatorios y las propias EROs, favoreciendo la disminución de los niveles de ácido úrico.

Por otra parte, se ha reportado en estudios realizados en animales y humanos una mejoría en los valores de glucemia como respuesta a la administración de vitamina E en diabéticos por mecanismos aun no dilucidados.<sup>(12)</sup> Este aumento de la disponibilidad tisular de la glucosa permitiría una recuperación relativa de los niveles NADH, efector alostérico negativo de la xantina deshidrogenasa (XDH), que presenta mayor actividad catalítica para la formación de ácido úrico, favoreciéndose la isoforma xantina oxidasa/reductasa (XO/R), que es menos activa, disminuyendo también por esta vía los niveles séricos del metabolito. Ambos mecanismos pudieran explicar la disminución de este antioxidante endógeno en el grupo de ratas diabéticas suplementadas con vitamina E.

La mejoría relativa de la disponibilidad de glucosa en las células hepáticas permitiría también una mayor disponibilidad de glucuronato, facilitando la conjugación de la bilirrubina, aumentando su solubilidad y eliminación por la bilis, por lo que podrían disminuir los niveles séricos de bilirrubina total.

Al ser el ácido úrico y la bilirrubina, antioxidantes que aportan gran proporción de la capacidad antioxidante total, la disminución de sus valores séricos podrían evidenciar de forma indirecta la disminución del estrés oxidativo al administrar la vitamina E. <sup>(6)</sup>

Los resultados del presente estudio con relación a los niveles séricos de albúmina no solo demuestran que la STZ no disminuye la síntesis de la albúmina por el hígado en las ratas diabéticas, sino también que la acción antioxidante de la vitamina E no tiene efecto sobre el metabolismo de esta proteína. Es por ello que los niveles séricos de albúmina resultaron independientes del tratamiento con STZ y de la suplementación con vitamina E.

La dosis elevada de suplementación con sustancias antioxidantes, específicamente con vitaminas liposolubles como la vitamina E, es un aspecto a tener en cuenta por los efectos tóxicos que puede desencadenar un estado de hipervitaminosis.<sup>(13)</sup>

Si bien no se encontraron reportes en modelos experimentales de DM2 con relación a la influencia de las dosis de vitamina E sobre los niveles de bilirrubina y ácido úrico, en la presente investigación se evidenció que dosis pequeñas de 25mg/día de esta vitamina provoca el mismo efecto que dosis mayores de 50 mg/día sobre los niveles séricos de bilirrubina total, independientemente del tiempo de suplementación utilizado en el experimento. Por otra parte, la dosis mayor de vitamina E fue capaz de provocar una disminución significativa del ácido úrico en un tiempo más corto, es decir a los 15 días de administración de la vitamina E en las ratas diabéticas. A los 30 días la disminución del ácido úrico en respuesta a la suplementación se hizo independiente de la dosis, de manera que, si se pretende disminuir los niveles séricos de ácido úrico en la DM con suplementación con vitamina E a bajas dosis, se debe prolongar el tiempo de exposición a este antioxidante. Este resultado tiene un importante valor para un futuro tratamiento de la hiperbilirrubinemia y la hiperuricemia en la DM con bajas dosis de vitamina E; lógicamente se requieren otras investigaciones para probar en diferentes fases de los ensayos un número mayor de dosis de vitamina E.

Los antioxidantes endógenos nucleofílicos se determinaron a las 24 horas después de la inducción de la diabetes con STZ (tiempo cero), es decir, sin suplementación de vitamina E, y al concluir un período de 15 y 30 días de suplementación diaria con dicha vitamina.

Los niveles de albúmina sérica fueron independientes del tiempo de suplementación, cuando se utilizó 25 mg/día de vitamina E; sin embargo, la albúmina sérica aumentó significativamente a los 30 días de suplementación con relación al tiempo cero, lo que pudiera relacionarse con el efecto positivo de la vitamina E sobre la actividad de la insulina, la cual favorece la síntesis de la albúmina. Puede inferirse además la necesidad de un tiempo de administración más prolongado del antioxidante para evidenciar su efecto sobre los niveles séricos de albúmina, debido a que la vida media de esta proteína sérica está entre 14 y 20 días, y el ensayo duró un tiempo máximo de 30 días, de manera que a este tiempo estaba prácticamente iniciando el recambio de gran parte de esta proteína.

La disminución significativa del ácido úrico durante todo el tiempo del estudio significa que independientemente de la dosis utilizada de vitamina E, la disminución sérica de este metabolito será mayor mientras más se prolongue el tiempo de suplementación.

Para la bilirrubina total se observó que si bien la dosis más pequeña evaluada (25 mg de vitamina E) requirió un mayor tiempo para provocar una disminución significativa de la misma, la dosis de 50 mg/día de vitamina E, provocó una disminución significativa del metabolito durante todo el tiempo del experimento, de manera que si bien para un mismo tiempo de suplementación la disminución de la bilirrubina resultó independiente de la dosis (tabla 3), el factor tiempo hace a las variaciones de este antioxidante endógeno dependiente de la dosis, lo que se traduce en que para provocar en la DM una disminución más intensa de la bilirrubina total, como en el caso de una hiperbilirrubinemia, se deben utilizar dosis mayores de vitamina E durante un tiempo más prolongado.

Resulta interesante destacar que Kristoffer, en su estudio en humanos, no encontró influencia de la vitamina E sobre proteínas de choque calórico relacionadas con el sistema de defensa antioxidante, donde se incluye la hemoxigenasa 1, lo que de ser cierto sugiere que la disminución de los niveles de bilirrubina total encontrados no se deben a una afectación de la actividad de esta enzima reguladora de una de las reacciones limitantes en la formación de la bilirrubina, sino al aumento de su excreción en forma de bilirrubina directa por un posible aumento de la disponibilidad de glucosa y por tanto de glucuronato en el hepatocito.

## CONCLUSIONES

La disminución en los niveles séricos de ácido úrico y bilirrubina total resultó independiente de la dosis del antioxidante, lo que evidencia de forma indirecta la disminución del estrés oxidativo en la diabetes química experimental, con el suplemento de esta vitamina y el posible valor de este resultado para un futuro tratamiento de la hiperbilirrubinemia y la hiperuricemia en la DM con vitamina E. El tiempo de suplementación con vitamina E en la reducción de los niveles séricos de bilirrubina total resaltó dosis dependiente del antioxidante, lo que se traduce en que para provocar en la DM una disminución más intensa de la bilirrubina total, se deben utilizar dosis mayores de vitamina E durante un tiempo más prolongado. La suplementación con vitamina E en el modelo experimental pudiera justificar el uso futuro de este antioxidante para mejorar el balance en el equilibrio del sistema amortiguador global frente al estrés oxidativo en la DM.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Storino MA., Miguel A. Contreras, Jairo Rojano, Richard Serrano, Ana Nouel. Complicaciones de la diabetes y su asociación con el estrés oxidativo: un viaje hacia el daño endotelial. Revista Colombiana de Cardiología [Internet]. 2014 nov [citado 2016 Nov 15]; 21(6): 392-398. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0120563314000801>.
2. Eshaq RS, Wright WS, Harris NR. Oxygen delivery, consumption, and conversion to reactive oxygen species in experimental models of diabetic retinopathy. Redox Biol. [Internet]. 2014 Apr. 18 [citado 2016 Nov 15]; 2: 661-666. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052533/>
3. Okeoghene Ogbera A, Ezeobi E, Unachukwu C, Oshinaike O. Treatment of Diabetes Mellitus-associated neuropathy with vitamin E and Eve primrose. Indian J Endocr Metab 2014 [citado 2016 Nov 15]; 18(6): 846-849. Disponible en: <http://www.ijem.in/article.asp?issn=2230-8210;year=2014;volume=18;issue=6;spage=846;epage=849;aulast=Ogbera>
4. Fabbrini E, Serafini M, Colic Baric I, Hazen SL, Klein S. Diabetes. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects Journal list Diabetes [internet]. 2014 Mar [citado 2016 Nov 16]; 63(3): 976-981. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3931399/>
5. Heredia RD, Fernández CD, Alfonso RJ, Rodríguez VE, Santana GL, Rodríguez PM. Sistema antioxidante enzimático e indicadores de daño oxidativo en pacientes diabéticos tipo 2. Rev. chil. endocrinol. diabetes 2014 [citado 2016 Nov 15]; 7 (3): 94-98. Disponible en [http://www.revistasoched.cl/3\\_2014/4-heredia.html](http://www.revistasoched.cl/3_2014/4-heredia.html)
6. Cumming KT, Raastad T, Holden G, Bastani NE, Schneeberger D, Paronetto MP. Effects of vitamin C and E supplementation on endogenous antioxidant systems and heat shock proteins in response to endurance training. Physiological Reports [internet]. 2014 [citado 2016 nov 15]; 2(10): e12142. Disponible en: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.14814/phy2.12142>

7. Obregón O, Vecchionacce H, Brito S, Lares M, Castro J, Ramírez X. Efecto antiglicosilante de las vitaminas ey c. AVFT [internet]. 2005 [citado 2016 nov 15];24(1):1-7. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55924110>
8. Rodiño Janeiro BK, Raposeiras Roubin S, González Peteiro M, Ucieda Somoza F, González-Juanatey JR, Álvarez Castro E. La Albúmina Glicada Aumenta la Producción de Especies Reactivas del Oxígeno en el Endotelio Mediante la Activación del NF- $\kappa$ B y el Desacoplamiento de la Sintasa Óxido Nítrico Endotelial. Rev Esp Cardiol [internet]. 2011 [citado 2016 nov 15];64(Supl.3):157. Disponible en:<http://www.revespcardiol.org/controladores/congresos-herramientas.php?idCongreso=2&idSesion=276&idComunicacion=3091>
9. Mendoza Coussette U, García Piñeiro JC, Gastell PL, Amador Armenteros A. Xantina oxidorreductasa, propiedades, funciones y regulación de su expresión genética. Rev Cubana Invest Bioméd [internet].2005 [citado 2016 nov 15];24(2). Disponible en:[www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002005000200007](http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002005000200007)
10. López Gómez L. Consenso Venezolano sobre Ácido Úrico Como Factor de Riesgo Cardiovascular [internet]. 2016 [citado 2016 nov 15]: 1-130. Disponible en:<http://www.svemonline.org/wp-content/uploads/2016/04/consenso-venezolano-sobre-acido-urico.pdf>.
11. Sierra Ortega YG, Rodríguez González G. Diabetes Mellitus y estrés Oxidativo 2. Hospital Princess Margaret. Terapia Intensiva [internet]Revista Médica Electrónica. 2014 [citado 2016 nov 15]. Disponible en: <http://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/diabetes-mellitus-estres-oxidativo/>
12. Sánchez M, Maribel C, Rodríguez A, Rubén A, Martín V, Sepúlveda P. Estrés y vitaminas antioxidantes en pacientes diabéticos Tipo 2. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica [internet]. 2008 [citado 2016 nov 15];27(1): 59-65. Disponible en:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55927110>
13. Jansen E, Viezeliene D, Beekhof P, Gremmer E, Ivanov L. Tissue-Specific Effects of Vitamin E Supplementation Int. J. Mol Sci [internet] .2016 [citado 2016 nov 25];17(7): 1166;doi:10.3390/ijms17071166. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/7/1166/htm>

-

**Ariel Montier Iglesias:** Médico. Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral y en Bioquímica Clínica. Profesor Asistente. Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río. Facultad de Ciencias Médicas Ernesto Che Guevara de la Serna. Pinar del Río. Cuba. ***Si usted desea contactar con el autor de la investigación hágalo aquí***