

# Efecto protector de la vitamina C sobre el estrés oxidativo y daño al ADN en ratas con diabetes mellitus

Mendoza, C.; Flores, C.; Melendez, C.; Marquez, Y.C.; Matheus, N.

Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales “Dr. Haity Moussatché”,  
Fac. Cs. Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”,  
Barquisimeto, Venezuela. E-mail: carmenmendoza@ucla.edu.ve

## Resumen

**Mendoza, C.; Flores, C.; Melendez, C.; Marquez, Y.C.; Matheus, N.: Efecto protector de la vitamina C sobre el estrés oxidativo y daño al ADN en ratas con diabetes mellitus.** *Rev. Vet. 30: 1, 12-16, 2019.* La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica de origen endocrino, cuya principal característica bioquímica es la hiperglucemia crónica. Desencadena procesos bioquímicos graves para el organismo como el estrés oxidativo (EO). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto protector de la vitamina C (VitC) sobre el EO en ratas Sprague-Dawley con DM inducida por Streptozotocina (STZ). Se utilizaron 16 ratas ( $100 \pm 20$  g), divididas en 4 grupos: 1) control, 2) STZ (diabéticas), 3) VitC + STZ, 4) VitC. En homogenizado de hígado se determinó la concentración de malondialdehído, dienos conjugados y proteínas totales. Por otra parte se determinaron las actividades de superóxido dismutasa y catalasa. También se midió el daño al ADN hepático por ensayo cometa. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante programa SPSS versión 17.0 para Windows. Se aplicó un Anova y una prueba de comparación múltiple DMS ( $p < 0,05$ ). Se pudo evidenciar que en el grupo de animales tratados con VitC disminuyeron los niveles de glucosa y la generación de EO; también hubo menor daño del ADN por radicales libres. Estos datos permiten inferir que la VitC ejerce una efectiva acción antioxidante y protectora del hígado ante la permanente producción de radicales libres; además de ser efectiva en la reparación y conservación del ADN.

**Palabras clave:** rata, diabetes mellitus inducida, vitamina C, daño al ADN.

## Abstract

**Mendoza, C.; Flores, C.; Melendez, C.; Marquez, Y.C.; Matheus, N.: Protective effect of vitamin C on oxidative stress and DNA damage in rats with diabetes mellitus.** *Rev. Vet. 30: 1, 12-16, 2019.* Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease of endocrine origin, which main biochemical characteristic is chronic hyperglycemia. The aim of this study was to measure the protective effect of vitamin C (VitC) on oxidative stress in Sprague-Dawley rats with DM induced by Streptozotocin (STZ). We used 16 rats ( $100 \pm 20$ g), divided into 4 groups: 1) control, 2) STZ (diabetics), 3) VitC + STZ, 4) VitC. In liver homogenate, the concentration of malondialdehyde, conjugated dienes, and total proteins were determined, as well as the activity of superoxide dismutase and catalase. The ADN damage was measured by comet assay. The results were statistically analyzed using SPSS software version 17.0 for Windows. An Anova test and a multiple DMS comparison ( $p < 0.05$ ) were applied. In the group of animals treated with VitC a decrease in glucose levels was evidenced, as well as in the generation of oxidative stress. Less ADN damage induced by free radicals was also determined. It can be inferred that VitC is an effective antioxidant and is a liver protector against to the permanent production of free radicals by diverse sources and that it is also effective in the repair and conservation of ADN.

**Key words:** rat, induced diabetes mellitus, vitamin C, ADN damage.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por una concentración elevada de glucosa en sangre. Además de la hi-

perglucemia, el cuadro clínico incluye glucosuria, ceto-  
tosis y acidosis, entre otros daños. Existen varios tipos de DM los cuales se deben a una compleja interacción entre genética, factores ambientales y estilos de vida. Los de mayor incidencia son los tipos I y II<sup>13</sup>.

En la DM tipo I ocurre destrucción de las células beta del páncreas, lo cual conlleva a una deficiencia re-

lativa o absoluta de insulina. Esta clase se conoce como diabetes inmunomediada y representa del 5 al 10% de los casos. La DM tipo II abarca el 90-95% de los casos y se caracteriza por grados variables de resistencia a la insulina, trastornos en la secreción de la misma y aumento de la producción de glucosa<sup>13</sup>.

El riesgo de desarrollar DM tipo II aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física<sup>1</sup>. La enfermedad, al estar asociada a un incremento en el riesgo de padecer patologías cardiovasculares, predispone a una muerte prematura. Asimismo, eleva la posibilidad de sufrir ceguera, insuficiencia renal y amputaciones de miembros<sup>23</sup>.

Debido a la gran proliferación de este trastorno, para el año 2025 el número de personas con DM en el continente americano será aproximadamente de 64 millones y el 62% de los casos ocurrirán en América Latina y el Caribe<sup>3</sup>. En Venezuela, el número de personas con diabetes varía entre 460.000 y 1.000.000<sup>2</sup>.

Debido al aumento de su prevalencia, la DM es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Su prevalencia actual es de 3,5 a 4,5%. La incidencia más alta corresponde a Finlandia, donde la prevalencia abarca entre 35 y 40 personas/100.000 habitantes, casi el doble del índice de Estados Unidos, según fue señalado en 2003. Si se tiene en cuenta el sub-registro de DM, ella alcanzaría el 6%, del cual 85% correspondería a la DM tipo II. En Venezuela, más de un millón de personas la padecen, de las cuales la mitad se encuentra sin diagnóstico<sup>9</sup>.

El estrés oxidativo (EO) se ha relacionado con la patogénesis de la diabetes mellitus. El aumento de los radicales libres (RL) agrava la acción de la insulina a nivel periférico, contribuye a la disfunción de la célula beta pancreática<sup>10,19,21</sup> y está implicado en el desarrollo de las complicaciones crónicas<sup>11,12</sup>.

El organismo mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida de tal balance lleva a un estado de estrés oxidativo, el cual se caracteriza por un aumento en los niveles de RL y especies reactivas de oxígeno, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidante, causando daño y muerte celular.

Esto ocurre en patologías degenerativas de tipo infeccioso, inmune e inflamatorio, como la DM. La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud. En estados graves provoca alteraciones en el metabolismo celular, como destrucción de ADN, daño a los transportadores de iones y proteínas a través de membranas y peroxidación de lípidos<sup>8</sup>.

En pacientes diabéticos existe un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y oxidantes, habiéndose demostrado una disminución de los niveles plasmáticos de enzimas antioxidantes, de glutatión y de vitaminas antioxidantes.

Por otro lado, en estos enfermos existe evidencia de un aumento de la peroxidación lipídica mediada por radicales libres. Los antioxidantes de la dieta juegan un papel importante en la defensa frente al envejecimiento y las enfermedades crónicas como la DM, el cáncer y la enfermedad cardiovascular. Estas sustancias inactivan los RL implicados en el EO e impiden su propagación. La suplementación con antioxidantes podría tener un efecto beneficioso al mejorar la morbimortalidad de los pacientes diabéticos<sup>5,6,7</sup>, de tal forma que podrían prevenir y retrasar el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes<sup>6</sup>.

En esta investigación de corte longitudinal nos planteamos determinar el efecto protector de la vitamina C (VitC) sobre el EO en la DM experimental.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 16 ratas hembras Sprague-Dawley pertenecientes a la población del Bioterio Central de la Universidad Centroccidental de Barquisimeto (Venezuela). El peso promedio de las ratas fue de 100 g. Se mantuvieron en jaulas individuales, con libre acceso al agua y una dieta comercial estándar, bajo ciclos de luz de 12 horas.

Las ratas fueron divididas en cuatro grupos: 1 = control, grupo 2 = diabéticas (inyectadas con streptozotocina (STZ) a dosis de 60 mg/kg de peso, grupo 3 = VitC + STZ (tratados con VitC 700 mg/kg via oral + STZ) y grupo 4 = tratados con VitC).

En el día 1 del experimento, a todos los animales se les extrajo una muestra de sangre (sin someterlos a ayuno), por medio de una punción cardiaca. La sangre se centrifugó a 3500 revoluciones por minuto, durante 15 minutos, a 15°C en una centrifuga Eppendorf 5402 (Westbury, NY, USA).

En el plasma se determinó el nivel de glucosa por el método enzimático de Trinder (1969)<sup>20</sup> mediante kit *Qualitest*. Estos análisis sanguíneos se repitieron el día del sacrificio. A las ratas de los grupos 2 y 3 se les indujo diabetes por administración de una inyección intraperitoneal de STZ (60 mg/kg por cada 1000 g de peso corporal) diluida en buffer citrato de sodio.

A los grupos experimentales 3 y 4 se les administró el tratamiento con VitC (700 mg/kg en el agua de bebida, durante 6 días), a partir del quinto día de la inducción de diabetes. Luego de un ayuno de 12 h las ratas se sacrificaron bajo ligera eterización y se disecó el hígado para obtener un homogeneizado del tejido, registrándose su aspecto macroscópico.

El homogeneizado fue mantenido en hielo y en el sobrenadante se determinaron los niveles de las concentraciones de malondialdehído (MDA) por el test para sustancias reaccionantes con el ácido 2-tiobarbitúrico (técnica de Ohkawa 1979), dienos conjugados (DC) por el método descrito por Wallin (1993)<sup>22</sup> y proteínas totales mediante el kit BioRad Richmond, basado en el método de Bradford (1976)<sup>4</sup>.

Se utilizó como estándar una solución madre de 1,41 mg/ml de albúmina sérica bovina y luego un trozo del hígado se homogenizó con sacarosa 0,25 M y se diluyó al 10% p/v para centrifugarse a 12.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante con pipeta Pasteur y en él se determinó la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) mediante un kit comercial (Calbiochem).

Otro trozo de tejido hepático fue homogenizado con la solución buffer provista por el kit Calbiochem y en el sobrenadante se determinó la actividad de la catalasa (CAT) mediante el *protocolo de Aebi*. Para medir el daño al ADN hepático en ratas ocasionado por la DM, se realizó una electroforesis en células individuales (“ensayo cometa”), técnica basada en la capacidad de los fragmentos de ADN para ser embebidos en un gel de agarosa y responder a un campo eléctrico. La corrida del extendido de ADN depende directamente del daño del ADN presente en las células.

Es importante mencionar que las lesiones al ADN consisten en rotura de las cadenas después del tratamiento con álcali o sin éste, e incluso de la combinación con ciertas enzimas, lo cual incrementa la migración de ADN. Esta técnica permite detectar daños en el ADN de una célula en condiciones experimentales de pH alcalino, y permite revelar la presencia de rompimiento en una hebra simple o doble del ADN en los sitios lábiles a la alcalinidad.

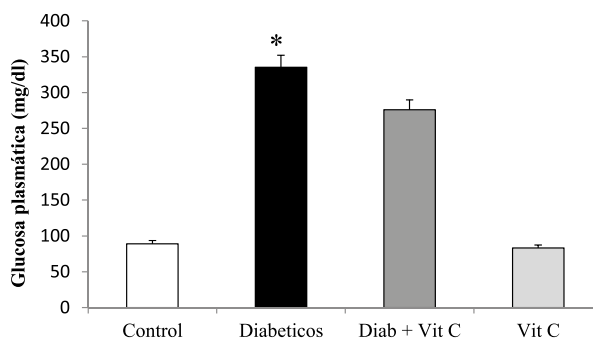
Así, las células en estudio son colocadas en agarosa, lisadas y luego sometidas a electroforesis bajo condiciones específicas. En la lisis, las células pierden sus proteínas y no son capaces de reparar el ADN dañado. Durante la electroforesis, el ADN dañado y fragmentado migra dentro del gel desde el núcleo hacia la dirección del ánodo. La cantidad de ADN migrado constituye una medida de la extensión del daño.

La observación del ADN se realizó a través de la tinción con el colorante bromuro de etidium, siendo examinado por fluorescencia de emisión con un filtro de excitación de 515 nm y emisión de 560 nm. Las células que contienen ADN dañado aparecen después de la electroforesis con una *aparición de cometa*, con una cabeza brillante y una cola. Por el contrario, las células que contienen ADN sin lesión, aparecen con un núcleo intacto y sin cola<sup>18</sup>.

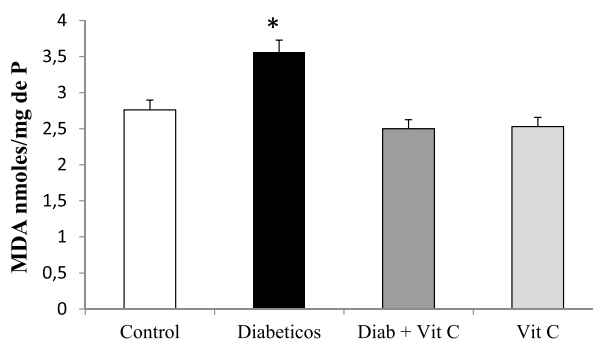
Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el programa SPSS versión 17.0 para Windows, aplicándose una prueba Anova y otra de comparación múltiple con diferencia mínima significativa-DMS ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio realizado evidenció un aumento de los niveles de glucosa sanguínea en las ratas tratadas con STZ. Los datos confirmaron el efecto diabetogénico provocado por este compuesto, el cual se manifiesta hasta los 7 días post-inducción (Figura 1). Este resultado coincide con el obtenido por otros investigadores,



**Figura 1.** Efecto de la vitamina C sobre la glucemia de ratas controles y experimentales con diabetes ( $X \pm DS$ ). Asterisco indica diferencia significativa ( $*p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Efecto de la vitamina C sobre la concentración hepática de malon-dialdehído en ratas controles y experimentales ( $X \pm DS$ ). Asterisco indica  $*p < 0,05$ .

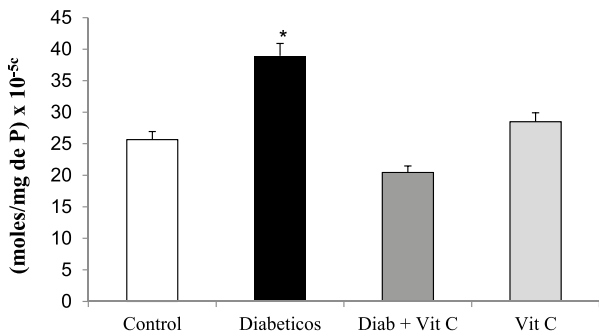
quienes señalan que la STZ genera un efecto diabetogénico en los animales de laboratorio<sup>10, 16</sup>.

También se ha demostrado que la administración de altas dosis de STZ en animales de laboratorio causa la muerte de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas en 24 h y su administración en dosis baja permite realizar el estudio citotóxico de este compuesto<sup>14</sup>.

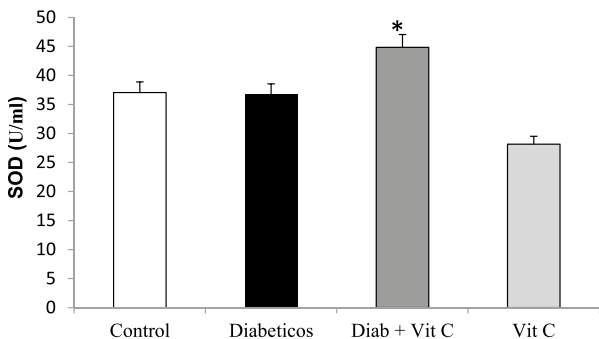
El incremento de la concentración de glucosa ocasiona aumento proporcional de productos de la glicosilación no enzimática, que pueden ser escasamente dañinos si se logra un buen control metabólico, pero en caso contrario generan productos finales de la glicosilación avanzada, con degradación oxidativa y liberación de RL que dañan la estructura y funcionalidad de las proteínas<sup>17</sup>.

El desbalance entre la producción de RL y antioxidantes genera estrés oxidativo, el EO leve puede llevar a la célula a tener más resistencia para injurias posteriores en una buena regulación de los sistemas de defensa antioxidante. Por el contrario, si el EO es muy intenso, afectaría a todos los componentes de la célula (ADN, lípidos y proteínas)<sup>15</sup>.

Además del característico cuadro hiperglucemiantes crónico, la DM es responsable de este tipo de complicaciones, por lo que a lo largo de los años se han buscado alternativas terapéuticas para mejorar la calidad de vida de pacientes diabéticos, como es el caso de la



**Figura 3.** Efecto de la vitamina C sobre la concentración hepática de dienos conjugados en ratas controles y experimentales ( $X \pm DS$ ). Asterisco indica  $*p < 0,05$ .



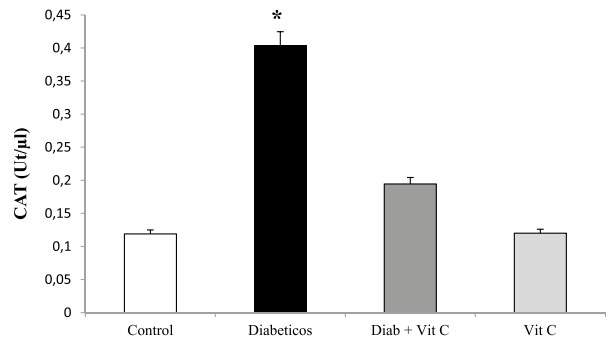
**Figura 4.** Efecto de la vitamina C sobre la concentración hepática de superóxido dismutasa en ratas controles y experimentales ( $X \pm DS$ ). Asterisco indica  $*p < 0,05$ .

VitC, la cual -por sus beneficios- ha sido utilizada como antioxidante.

En esta investigación se midió el efecto protector de la VitC ante la generación de estrés oxidativo y daño al ADN en ratas con diabetes experimental. En cuanto al grado de EO, se pudo apreciar un efecto hepatoprotector de la VitC, evidenciado por una disminución muy significativa ( $p < 0,05$ ) de los niveles de MDA (nmoles/mg de proteínas) en el grupo de diabéticos tratados con VitC, al compararlo con el grupo control (Figura 2). En el caso de los DC, productos iniciales del proceso de lipoperoxidación, se observó una disminución de los mismos en los animales tratados con el antioxidante respecto al control (Figura 3).

Al medir la enzima SOD se observó (Figura 4) un aumento significativo de su actividad ( $p < 0,05$ ) expresada en U/ml en el grupo de animales tratados con VitC, al compararlo con el grupo control. En forma similar, se obtuvo un aumento significativo en la actividad de CAT (Figura 5).

Existe evidencia experimental que indica que el EO puede determinar el comienzo y la progresión



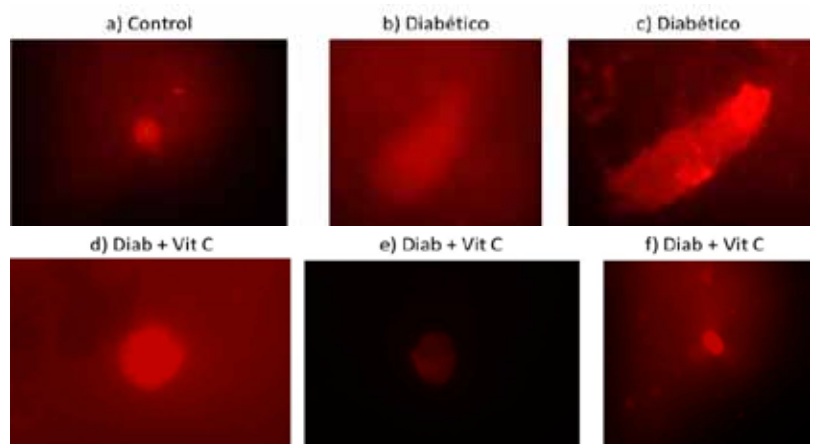
**Figura 5.** Efecto de la vitamina C sobre la concentración hepática de catalasa en ratas controles y experimentales ( $X \pm DS$ ). Asterisco indica  $*p < 0,05$ .

de las complicaciones tardías de la DM; sin embargo hay controversia respecto a si su aumento es asociativo o causal de esta enfermedad. Se ha demostrado que existe aumento de RL acompañado de una disminución de agentes antioxidantes en pacientes diabéticos <sup>6</sup>.

Los radicales libres son átomos o moléculas que en su último orbital tienen un electrón no apareado; al tratar de obtener su estabilidad, puede afectarse la fisiología de las células al oxidar a los lípidos de membrana, a los carbohidratos, a las proteínas o al ADN, lo cual sería un daño causado por el EO <sup>8</sup>. En esta investigación se midió el efecto de la VitC sobre la posible alteración en el ADN causado por el EO.

En la Figura 6 se puede observar la migración del ADN, al formarse una imagen nítida de la "cola del cometa", obtenida en los animales diabéticos. Por el contrario, la imagen proveniente del grupo control no revela migración, ni formación de la *cola*, mientras que en las provenientes del grupo tratado con VitC se observó una leve migración y -en algunos casos- imágenes muy similares al grupo control. Ello permite inferir que la VitC previene daños en el ADN, característicos en los pacientes con diabetes.

En conclusión, surge que la vitamina C constituye un efectivo antioxidante y un importante protector del hígado, ante la producción permanente de radicales li-



**Figura 6.** Electroforesis en células individuales (*ensayo cometa*). Imágenes de cometas encontrados en las muestras hepáticas con y sin tratamiento de vitamina C (Vit C) en ratas con diabetes experimental (Diab). 40X.

bres por diversas fuentes, además de ser efectiva en la reparación y conservación del ADN.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado (Venezuela), a través del proyecto de Código 014-VE-2012.

## REFERENCIAS

1. **American Diabetes Association.** 2012. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. URL: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/>
2. **Avilán J.** 2004. Epidemiología de la diabetes en Venezuela. *Gaceta Méd Caracas*, 112: 3-65.
3. **Barceló A, Rajpathak S.** 2001. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. *Rev Panam Salud Pú* 10: 5.
4. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
5. **Brown AA, Hu FB.** 2001. Dietary modulation on endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 71: 673-686.
6. **Ceriello A, Motz E.** 2004. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 816-823.
7. **Ceriello A, Testa R.** 2009. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32: 32-36.
8. **Chacín L.** 1999. *Diabetes en Venezuela*. [http://www.diabetes.al.dia.com/diabetes\\_en\\_venezuela.htm#scene\\_1](http://www.diabetes.al.dia.com/diabetes_en_venezuela.htm#scene_1) [Consulta: 2002, Mayo 27].
9. **Dorado CM, Rugerio CV, Rivas SA.** 2003 Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM* 6: 46.
10. **Evans JL, Goldfine IP, Maddus BA, Grodsky GM.** 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52: 1-8.
11. **Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME.** 2008. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57:1446-1454.
12. **Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G.** 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257-267.
13. **Harrison T.** 2006. *Principios de Medicina Interna*, 16 ed., Mc Graw Hill, Méjico, p. 2367.
14. **Hugues B, Rodríguez J, García J.** 2001. Animales de laboratorio en la endocrinología: biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1. *Rev Cubana Endocrinol* 12: 168-177.
15. **Kawada J.** 1992. New hypotheses for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus. *Yakugaku Zasshi* 112: 773-791.
16. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann Biochem* 95: 351-358.
17. **Organización Mundial de la Salud.** 2001. *Boletín Epidemiológico* 22: 2. URL: [http://www.paho.org/spanish/sha/be\\_v22n2-diabetes.html](http://www.paho.org/spanish/sha/be_v22n2-diabetes.html)
18. **Patton W, Chakravarthy U, Davies J, Archer D.** 1999. Comet assay of UV-induced DNA damage in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol & Visual Sci* 40: 3268-3275.
19. **Robertson R, Harmon J, Oanh P, Poitout V.** 2004. Beta cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 119-124.
20. **Trinder P.** 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path* 22: 158-161.
21. **Venereo JR.** 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 31: 126-133.
22. **Wallin B, Rosengren B, Shertzer H, Camejo G.** 1993. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants. *Analyt Biochem* 208: 10-15.
23. **Wen Y, Skidmore JC, Porter MM, Rea CA, Khokher MA, Singh BM.** 2002. Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. *Diabetes Obes Metab* 45: 305-308.