

EFFECTO NEFROPROTECTOR DEL D-005, EXTRACTO LIPÍDICO DEL FRUTO DE *ACROCOMIA CRISPA*, EN UN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN RENAL EN RATAS

Ambar, Oyarzábal Yera¹, Sandra, Rodríguez Salgueiro¹, Nelson, Merino García¹, Leyanis, Ocaña Nápoles¹, Lucía, González Núñez², Licet, Mena Valdés¹, Zullyt, Zamora Rodríguez¹, José A., Medina Pírez¹, Sonia, Jiménez Despaigne¹, Vivian, Molina Cuevas¹.

¹Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

²Departamento de Ciencias Morfológicas, Escuela Latinoamericana de Medicina.

La Habana, Cuba.

e-mail primer autor: ambar.oyarzabal@cnic.edu.cu

Resumen

Introducción: La isquemia-reperfusión renal causa daño renal agudo relacionado principalmente con la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que puede conducir a necrosis tubular aguda e inflamación. El D-005, extracto lipídico obtenido del fruto de la Palma Corojo (*Acrocomia crispera*) presenta efectos antioxidantes y antiinflamatorios. **Objetivo:** Evaluar el efecto del D-005 sobre los cambios histológicos en riñones de ratas con daño renal agudo inducido por isquemia-reperfusión renal. **Materiales y métodos:** Se emplearon 42 ratas machos Sprague-Dawley distribuidas en seis grupos: un control negativo y cinco grupos sometidos a isquemia-reperfusión renal: un control positivo tratado con el vehículo, tres grupos tratados con D-005 (25, 100 y 400 mg/kg) y uno con Dexametasona (3 mg/kg). Se indujo isquemia renal bilateral durante 30 min y se reperfundió durante 24 h. Se procesó un riñón por animal mediante la técnica histológica de inclusión en parafina y

tinción con hematoxilina y eosina. Se determinó el daño histológico renal global y el daño tubular. **Resultados:** El tratamiento oral con D-005 a las dosis de 100 y 400 mg/kg redujo significativamente el daño histológico renal global, mientras que todas las dosis ensayadas protegieron significativamente del daño tubular renal. El D-005 previno la necrosis celular y el taponamiento de las luces tubulares en los túbulos proximales de la corteza renal. **Conclusiones:** El tratamiento oral con D-005 protegió de los cambios histológicos en la corteza renal y en especial, en los túbulos proximales en ratas sometidas a isquemia-reperfusión renal. Este resultado constituye la primera evidencia de que el D-005 ejerce un efecto beneficioso sobre el daño renal agudo.

Palabras clave: D-005, antioxidante, antiinflamatorio, daño renal agudo, isquemia-reperfusión renal, ratas

Introducción

La isquemia-reperfusión (I/R) renal causa daño renal agudo (DRA) dependiendo del tiempo de privación de oxígeno. Este daño ocurre en diferentes condiciones clínicas incluidas el trasplante de riñón, el cardiopulmonar, la cirugía de aneurisma aórtica, el shock hemorrágico severo y la sepsis por endotoxinas, las cuales se asocian con una alta mortalidad y morbilidad.^{1,2,3}

El DRA inducido por I/R está relacionado principalmente con la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales desencadenan una cascada de señalización molecular que puede conducir a la necrosis tubular aguda y en consecuencia, a la insuficiencia renal aguda (IRA)⁴. Sin embargo, al igual que otros tejidos sometidos a I/R, el riñón puede recuperarse y tener una función normal, si se interrumpen a tiempo las vías de daño celular involucradas en la I/R.^{5,6}

Los tratamientos actuales utilizados en la clínica no son eficientes para limitar la progresión del DRA hacia una IRA, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a acelerar la regeneración de las células tubulares renales y a prevenir el DRA. En este sentido, aún cuando se han evaluado nuevos fármacos para prevenir y tratar el DRA por I/R, estos presentan limitaciones en su uso o se encuentran en fase de estudios preclínicos y clínicos.^{7,8}

Teniendo en cuenta el papel de las ERO en el desarrollo y progresión del DRA por I/R se ha demostrado que sustancias de origen natural con probados efectos antioxidantes constituyen alternativas terapéuticas prometedoras en el tratamiento y prevención del DRA y de la IRA inducidos por I/R.^{9,10} Estos resultados se sustentan sobre la base de sus efectos para prevenir el estrés oxidativo y la inflamación asociada al mismo.¹¹ En este contexto, un extracto obtenido de la palma *Euterpe oleracea*, conocida como acaí, perteneciente a la familia *Arecaceae* mostró efecto protector en un modelo de I/R renal a la vez que disminuyó los niveles de malondialdehído y la actividad de la enzima

mieloperoxidasa (MPO), marcadores de peroxidación lipídica e inflamación, respectivamente.¹²

El D-005, extracto lipídico obtenido del fruto de la Palma Corojo (*Acrocomia crispata*), palma endémica de Cuba también de la familia *Arecaceae*, contiene una mezcla reproducible de ácidos grasos, principalmente oleico, palmítico, laúrico y mirístico mientras el palmitoleico, caprílico, cáprico, y esteárico se encuentran en menores concentraciones.^{13,14}

Estudios previos demostraron que el D-005 ejerce efectos anti-inflamatorios *in vitro* mediante la inhibición dual de las enzimas 5-lipooxigenasa (5-LOX) y ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2),¹⁵ e *in vivo* al inhibir el infiltrado inflamatorio en el tejido pulmonar de ratones con daño pulmonar agudo.¹⁶

Además, el D-005 mostró efecto antioxidante al disminuir los niveles de malondialdehído y grupos sulfihidrilos, marcadores de peroxidación lipídica y oxidación proteica, respectivamente, en próstatas de ratas con hiperplasia prostática inducida por testosterona.¹⁷

Teniendo en cuenta el importante papel que desempeñan el estrés oxidativo y la inflamación en la etiología del DRA, resulta lógico suponer que el D-005 pueda prevenir el daño en riñones inducido por I/R.

Objetivos

Evaluar el efecto del D-005 sobre los cambios histológicos en riñones de ratas con DRA inducido por isquemia-reperfusión renal.

Materiales y métodos

Animales y tratamientos

Se emplearon 42 ratas machos Sprague-Dawley clínicamente sanas, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Mayabeque), con peso promedio entre 400-500 g. Las ratas se mantuvieron en un Bioterio, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y

temperatura entre 20 y 25 °C. Se alimentaron diariamente con dieta estándar (CENPALAB) y agua corriente *ad libitum*.

El D-005 (Centro de Productos Naturales del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba) se administró por vía oral en forma de suspensión en Tween 65/H₂O (2 %), luego de corroborar sus especificaciones de calidad mediante un método validado por cromatografía gaseosa.¹⁴ La Dexametasona (Industria Farmacéutica, La Habana, Cuba) se administró por vía intraperitoneal (i.p) y se disolvió en buffer citrato 0,1 mol/L (pH 4,2). Ambas sustancias se administraron 1 h antes de inducir la I/R renal.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos (siete ratas/grupo): un control negativo (sin daño) y cinco grupos a los cuales se les indujo el daño por I/R renal: un grupo (control positivo) tratado con el vehículo (Tween 65/H₂O), tres grupos tratados con D-005 (25, 100 y 400 mg/kg) y un grupo con Dexametasona (3 mg/kg).

Inducción de la I/R renal

Las ratas se anestesiaron con tiopental sódico (vía i.p) a la dosis de 30 mg/kg de peso corporal. Posteriormente, se les realizó la laparotomía por incisión longitudinal en la línea media ventral. Se expusieron los paquetes vasculares renales, se aislaron ambas arterias renales, en las cuales se colocaron las pinzas de oclusión (clanes) y se provocó la isquemia durante 30 min. Luego se retiraron los clanes, permitiendo la reperfusión de los riñones durante 24 h.¹⁸

Una vez concluido el tiempo de reperfusión, los animales se anestesiaron en atmósfera de halotano, y se extrajo el riñón izquierdo para el estudio histológico.

Procesamiento histológico

Los riñones extraídos se seccionaron mediante un corte sagital a través del hilio y se fijaron por inmersión en formol tamponado al 4%. Posteriormente, se realizó la deshidratación de los riñones en etanol a concentraciones crecientes

desde el 70% hasta el 100 %. Se incluyeron en bloques de parafina y se realizaron cortes de 3-5 μm de grosor mediante un micrótomo Sakura. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Estudio histológico

Se realizó el análisis histológico del daño renal global y del daño tubular.

- Daño renal global

Se determinó a partir de la observación directa al microscopio óptico utilizando el lente objetivo de 10 X, asignándole un valor de grado histopatológico al daño alcanzado siguiendo la escala de Jablonski donde: 1- necrosis de células individuales, 2- necrosis de todas las células en túbulos adyacentes con supervivencia de otros túbulos, 3- necrosis confinada al tercio distal del túbulo proximal con una banda de necrosis que se extiende a través de la corteza interna y 4- necrosis que afecta a los tres segmentos del túbulo proximal.¹⁹

- Daño tubular

Se evaluó mediante el análisis de las imágenes de 10 campos histológicos ubicados a distancias regulares desde el polo superior al inferior de cada riñón, mediante una cámara digital Canon EOS 1000 D#2 acoplada a un microscopio óptico Zeiss Primo Star, utilizando una magnificación de 64 X. En cada imagen se evaluó el estado de los túbulos renales considerando 0 la ausencia de daño y 1 la presencia de daño irreversible; el cual se analizó por la presencia de túbulos con luces taponadas completamente, con presencia de cilindros hialinos y/o de células necróticas descamadas del epitelio. Los resultados se expresaron como porcentaje de campos histológicos dañados por animal.

Procesamiento estadístico

Los datos se procesaron mediante el programa Graph Pad Prism versión 5.0 para Windows. En todos los casos, se determinaron los valores de media y desviación estándar mediante estadística descriptiva y se realizaron

comparaciones entre los grupos. Para determinar si los datos cumplían una distribución normal, se realizó la prueba Kolmogorov-Smirnov. En el caso del Daño renal global, no se cumplió la normalidad por lo que se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. En cambio, los datos de Daño tubular sí cumplieron una distribución normal, por lo que se utilizó la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Daño renal global

Los resultados obtenidos sobre el daño renal global se muestran en la Fig. 1. La I/R renal indujo en los animales del grupo Control positivo un daño renal global significativamente superior al de los animales del grupo control negativo. Por su parte, el D-005 disminuyó el daño desde la dosis menor ensayada (25 mg/kg), si bien solo resultó significativo respecto al Control positivo a las dosis de 100 y 400 mg/kg. La Dexametasona (sustancia de referencia) también disminuyó el Grado histopatológico, aunque no fue significativo.

Daño tubular

Los animales del grupo control negativo mostraron la estructura normal de los túbulos proximales de la corteza renal (Fig. 2 A) mientras que los animales a los que se les provocó la I/R renal (grupo Control positivo) presentaron necrosis celular, taponamiento de las luces tubulares con células descamadas y formación de cilindros (Fig. 2 B). Los tratamientos con D-005 (25, 100 y 400 mg/kg) y Dexametasona previnieron el daño de los túbulos proximales corticales (Fig. 2 C, D).

El análisis cuantitativo permitió determinar que el grupo Control positivo presentó Daño tubular en el 74,92 % de los campos histológicos analizados. El D-005 disminuyó significativamente el Daño tubular a las dosis evaluadas. La sustancia de referencia (Dexametasona) también disminuyó significativamente el Daño tubular en la corteza renal (Fig. 3).

Discusión

Los resultados de esta investigación demuestran el efecto nefroprotector del D-005 sobre los cambios histológicos inducidos por I/R renal en ratas.

Los daños observados en el grupo Control positivo se corresponden con lo descrito por otros autores en condiciones similares.^{18,20} Los valores mayores de grado histopatológico en el grupo Control positivo se deben a la mayor afectación observada en la corteza renal profunda a consecuencia de la I/R; lo cual se asocia con el hecho de que esta es la zona del riñón más sensible a la hipoxia ya que en condiciones fisiológicas se requieren niveles más altos de oxígeno.²¹

Los resultados obtenidos en este trabajo con relación al mayor daño tubular en el grupo Control positivo coinciden con hallazgos previos que reconocen la lesión de los túbulos proximales corticales, con muerte de células epiteliales, tanto por necrosis como por apoptosis, como la característica histopatológica predominante en la I/R renal. En consecuencia, la pérdida del funcionamiento de las células epiteliales de los túbulos proximales renales se considera la causa principal para el desarrollo y progresión del DRA por I/R.²²

Por tanto, los efectos beneficiosos del D-005 sobre la morfología renal cortical, específicamente en los túbulos proximales, pudieran estar asociados a sus efectos antioxidantes.

El estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria están estrechamente relacionados entre sí en la fisiopatología de la I/R renal.

La producción de ERO se incrementa durante la isquemia debido al estado de hipoxia que se genera y que afecta la microcirculación, las enzimas celulares y la función mitocondrial, favoreciendo la producción intracelular de ERO, lo que desencadena las vías de muerte celular. Además, el daño isquémico activa la producción de citosinas proinflamatorias, las cuales contribuyen también a la formación de ERO por la vía de las enzimas NADPH oxidasa (NOX) y MPO. Otra

vía por la cual se induce la generación de ERO es la modificación de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) debido a la disfunción vascular promovida por la isquemia. Sin embargo, el estado isquémico no es el único causante del daño por ERO, durante el proceso de reperfusión también se estimula el daño oxidativo.¹¹ En este sentido, sustancias de origen natural con propiedades antioxidantes han mostrado efectos protectores en modelos de I/R renal.^{23, 24}

Por otra parte, se ha demostrado que el proceso de isquemia activa las vías de la LOX, resultando en la adhesión y activación endotelial de leucocitos, y de la COX, con la consecuente producción de prostaglandinas vasoconstrictoras.²⁵ En correspondencia con estos resultados, se ha evaluado el efecto de fármacos antiinflamatorios en modelos murinos de DRA inducido por I/R renal. Así, la indometacina mejoró la función renal y redujo el daño renal evaluado histológicamente en ratones, al modular la respuesta inflamatoria por inhibición de la COX.²⁶ Asimismo, el paricalcitol, protegió contra el daño isquémico al regular la COX-2 y la prostaglandina E2 (PGE2).²⁷ Por lo que, podemos sugerir el efecto del D-005 sobre la protección del parénquima renal afectado por la I/R renal podría estar dado por su inhibición dual sobre las enzimas LOX y COX-2.

No obstante, futuros estudios deberán dilucidar los mecanismos por los cuales el D-005 ejerce su efecto nefroprotector en el DRA inducido por I/R renal.

Conclusiones

El tratamiento oral con D-005 protegió de los cambios histológicos en la corteza renal y en especial, en los túbulos proximales en ratas sometidas a isquemia-reperfusión renal. Este resultado constituye la primera evidencia de que el D-005 ejerce un efecto beneficioso sobre el daño renal agudo.

Bibliografía

- ¹ Hobson C, Lysak N, Huber M, Scali S, Bihorac A, Fla G. Epidemiology, outcomes, and management of acute kidney injury in the vascular surgery patient. *J Vasc Surg* 2018;1-13.
- ² Nie S, Tang L, Zhang W, Feng Z, Chen X. Are There Modifiable Risk Factors to Improve AKI? *BioMed Res Int* 2017, ID 5605634:1-9.
- ³ Sawhney S, Fraser S D. Epidemiology of AKI: Utilizing Large Databases to Determine the Burden of AKI. *Adv Chronic Kidney Dis* 2017;24(4):194-204.
- ⁴ Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev* 2015;4(2):20-27.
- ⁵ Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012;298:229–317.
- ⁶ Fattah H, Vallon V. Tubular Recovery after Acute Kidney Injury. *Nephron* 2018:en prensa
- ⁷ Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007;376:1–43.
- ⁸ Yang y, Song M, Liu Y, Liu H, Sun L, Peng Y, Liu F, Venkatachalam MA, Dong Z. Renoprotective Approaches and Strategies in Acute Kidney Injury *Pharmacol Ther* 2016;163:58–73.
- ⁹ Dehghan Shahreza F. Mechanistic impact of renal tubular cell protection by antioxidants. *Ann Res Antioxid* 2016;1(1):e11.
- ¹⁰ Boozari M., Hosseinzadeh H. Natural medicines for acute renal failure: A review. *Phytother Res* 2017;1–12.

-
- ¹¹ Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients* 2017;9:718.
- ¹² El Morsy EM, Ahmed MA, Ahmed AA. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by açai extract preconditioning in a rat model. *Life Sci* 2015;123:35-42.
- ¹³ González VL; Sierra R; Mas R; Pérez Y; Oyarzábal A; Rodríguez E; Molina V; Gámez R. Compounds from the fruits of *Acrocomia crispera* and *Acrocomia aculeata* for use against oxidative stress and inflammation. Patent WO 2013189467 <http://www.google.com/patents/wo2013189467A2>.
- ¹⁴ Sierra-Pérez RC, González-Canavaciolo VL, Rodríguez-Leyes EA, Marrero-Delange D, Vicente-Murillo R y Morales-Rico CL. Estudio fitoquímico de los frutos de *Acrocomia crispera*, palma endémica cubana. *Rev CENIC Ciencias Químicas* 2014;45:41-47.
- ¹⁵ Pérez Y, Oyarzábal A, Sierra R, Mas R, Molina V, Jiménez S, González V. Inhibition of cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) by D-005 (A lipid extract of *Acrocomia crispera* fruits). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2017;16 (3):319–328.
- ¹⁶ Mena L, Sierra R, Valle M, Molina V, Rodriguez S, Merino N, Zamora Z, González V, Medina J A. *Acrocomia crispera* fruits lipid extract prevents LPS-induced acute lung injury in mice. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2018:en prensa.
- ¹⁷ Pérez Y, Oyarzábal A, Sierra R, Mas R, Molina V, Jiménez S, González V. Oral administration of D-005, a lipid extract from Corajo palm (*Acrocomia crispera*) fruits, attenuates testosterone induced prostate enlargement and increased oxidative stress in rats. *Acad J Pharm Pharmacol* 2016;4(1):010-015.

¹⁸ Tirapelli LF, Barione DF, Trazzi BFM, Tirapelli DPC, Novas PC, Silva CS, Martinez M, Costa RS, Tucci S, Suaid HJ, Cologna AJ, Martins AC. Comparison of Two Models for Evaluation Histopathology of Experimental Renal Ischemia. *Transplant Proc* 2009;41:4083–4087.

¹⁹ Jablonski P, Howden O, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation* 1983;35:198-204.

²⁰ Heyman SN, Rosenbergerb HC, Seymour R. Acute Kidney Injury: Lessons from Experimental Models. *Contrib Nephrol* 2011;169:286–296.

²¹ Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis R J. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol.* 2017;7:113–170.

²² Zuk A, Bonventre JV. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med* 2016;67:293–307.

²³ Yüksel M, Yıldar, M, Başbuğ M, Çavdar F, Çıkman O, Akşit H, Aslan F, Akşit D. Does protocatechuic acid, a natural antioxidant, reduce renal ischemia reperfusion injury in rats? *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2017;23:1-6.

²⁴ Murat C, Duzova H, Baysal I, G€ulb CC, Kus G, Kutluk F, Cakin H, Seker S, Ilbegi E, Uslu S, Avcı U, Demir S, Akinci C, Atli S. The effect of *Hypericum perforatum* on kidney ischemia/reperfusion damage. *Renal Fail* 2017;39,1:385–391.

²⁵ Kinra M, Mudgal J, Arora D, Nampoothiri M. An insight into the role of cyclooxygenase and lipooxygenase pathway in renal ischemia. *Europ Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21:5017-5020.

²⁶ Feitoza CQ, Semedo P, Goncalves GM, Cenedeze MA, Pinheiro HS, Pavao dos Santos OF, Landgraf RG, Pacheco-Silva A, Saraiva-Camara NO. Modulation

of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. *Inflamm Res* 2010;59:167–175.

²⁷ Hwang HS, Yang KJ, Park KC, Choi HS, Kim SH, Yang CW, et al. Pretreatment with paricalcitol attenuates inflammation in ischemia-reperfusion injury via the up-regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(5):1156–1166.

Anexos:

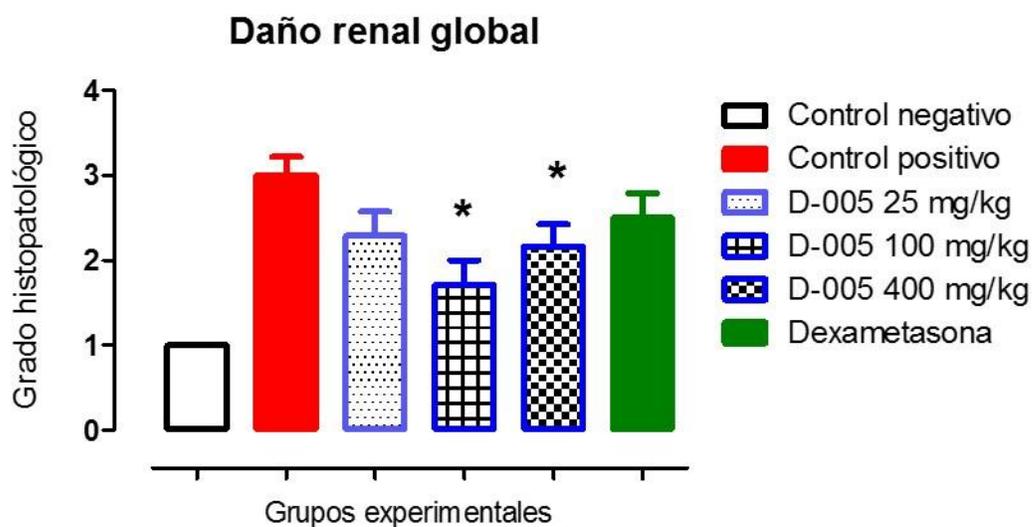


Fig. 1. Efectos del D-005 en el Daño renal global inducido por isquemia-reperfusión en ratas Sprague-Dawley. Prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Las comparaciones se realizaron respecto al grupo Control positivo.

* $p \leq 0,05$.

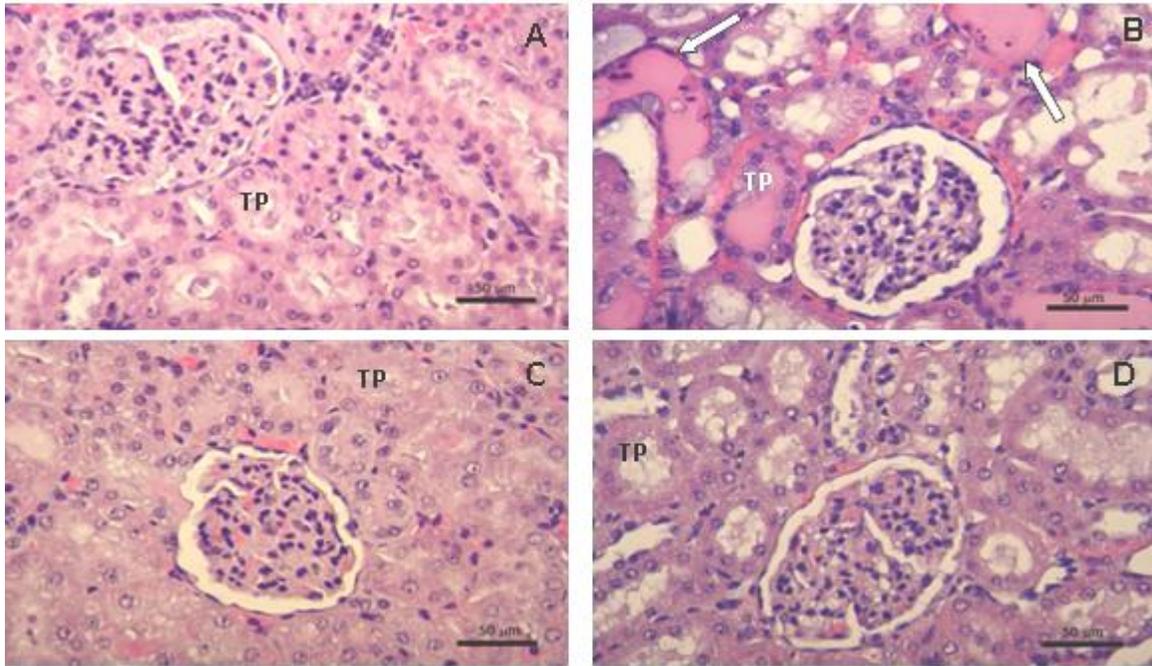


Fig. 2. Corteza renal de ratas Sprague-Dawley. Tinción de hematoxilina y eosina. A) Control negativo, B) Control positivo, C) D-005 100 mg/kg, D) Dexametasona. Barras- 50 µm. TP- túbulos proximales, flechas- túbulos con luces taponadas por la presencia de células necróticas y cilindros hialinos. Barras: 50 µm.

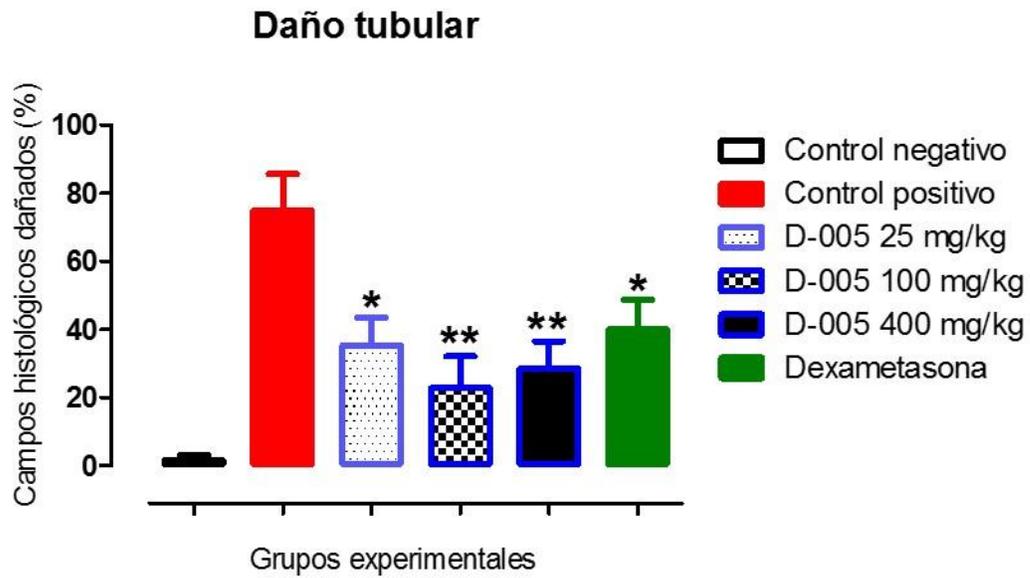


Fig. 3. Efecto del D-005 en el Daño tubular de la corteza renal inducido por isquemia-reperfusión en ratas Sprague-Dawley. Prueba paramétrica t de Student. Las comparaciones se realizaron respecto al grupo Control positivo.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.