

Glicosaminoglicanos: Una aproximación terapéutica novedosa para la prevención de las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes

Glycosaminoglycans: A new therapeutic approach for the prevention of the micro and macrovascular complications of diabetes

YAIRA MATHISON^{1,3}, JOSÉ VÁSQUEZ², CARLOS CIANGUEROTTI³, ANITA ISRAEL³,
EDUARDO ROMERO², CLAUDIA SUÁREZ⁴

Resumen

Se ha reportado una disminución de los niveles de glicosaminoglicanos (GAGs) en el riñón y otros órganos en modelos experimentales de diabetes y en humanos. La administración a largo plazo de heparina y otros GAGs previene las alteraciones morfológicas y funcionales del riñón en ratas diabéticas. Evaluamos el efecto del sulodexide, un glicosaminoglicano de baja actividad anticoagulante, sobre la función renal, la actividad de las enzimas antioxidantes, catalasa y superóxido dismutasa, y el efecto sobre la relajación arterial en un modelo experimental de diabetes tipo 1, inducida por estreptozotocina (STZ), en ratas. Los animales del grupo STZ presentaron un incremento marcado de la excreción de albúmina en orina, disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal, observándose un efecto beneficioso del tratamiento crónico con sulodexide al prevenir la albuminuria y restaurar la actividad de las enzimas antioxidantes. Adicionalmente, la diabetes disminuye la capacidad de relajación arterial en respuesta a la acetilcolina, y el pretratamiento con sulodexide previene la pérdida de la capacidad de relajación inducida por la diabetes, por un mecanismo que involucra la producción de óxido nítrico. Igualmente, previene las alteraciones estructurales observadas a nivel vascular. Nuestros resultados demuestran que la administración de sulodexide previene parcialmente el daño renal y la disfunción endotelial en este modelo experimental y sugiere un potencial uso terapéutico de este compuesto.

Palabras clave: glicosaminoglicanos, sulodexide, diabetes, microalbuminuria, daño renal.

Abstract

It has been reported a decreased levels of glycosaminoglycans (GAGs) in the kidney and other organs in experimental models of diabetes and in humans. The long-term administration of heparin and other GAGs prevents morphological and functional alterations in diabetic rat kidney. We evaluated the effect of sulodexide, a glycosaminoglycan with low anticoagulant activity, on the renal function, on the antioxidant enzymes activity, catalase and superoxide dismutase, and the effect on arterial relaxation in an experimental model of type 1 diabetes induced by streptozotocin (STZ) in rats. STZ group animals showed a marked increase of urinary albumin excretion, decreased activity of antioxidant enzymes in the renal cortex. Treatment with sulodexide showed a beneficial effect since prevented albuminuria and restored antioxidant enzyme activity. Diabetes reduces arterial relaxation ability in response to acetylcholine, and pretreatment with sulodexide prevents loss of the relaxing capacity induced by diabetes, by a mechanism involving the production of nitric oxide. It also prevents the structural alterations observed at vascular level. Our results demonstrate that administration of sulodexide partially prevents renal damage and endothelial dysfunction in this experimental model, and suggests a potential therapeutic use of this compound.

Key words: glycosaminoglycans, sulodexide, diabetes, microalbuminuria, renal damage.

¹ Cátedra de Farmacología, Escuela de Medicina José María Vargas.

² Laboratorio de Investigaciones Cardiovasculares, Escuela de Medicina José María Vargas.

³ Unidad de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia.

⁴ Sección de Patología Cardiovascular. Instituto Anatomopatológico. Universidad Central de Venezuela.

Dirigir correspondencia a: Dra. Yaira Mathison; E-mail: yaira57@yahoo.com; Cátedra de Farmacología. Escuela de Medicina José María Vargas. San Lorenzo a Pirineos. San José. Caracas.

Introducción

Entre las enfermedades crónicas, la Diabetes Mellitus (DM) es una de las más complejas y con mayor impacto en la población, si se consideran sus complicaciones y secuelas. Es una enfermedad determinada por factores genéticos y ambientales, en la que el sujeto que la padece presenta alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, junto con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a esta hormona. De tal forma la DM no es una simple enfermedad, sino un síndrome que debe enfocarse desde el punto de vista integral (De Islas y Revilla, 1999; Braundwald y Wilson, 2002).

Con la evolución de la enfermedad se presentan complicaciones crónicas, que son la causa de mortalidad más importante de estos pacientes en los países occidentales. La mayoría de pacientes con larga evolución de la enfermedad, presentan complicaciones microangiopáticas, en general renales y oculares, así como macroangiopatía con afección de las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía (Braundwald y Wilson, 2002). Dentro de estas complicaciones destaca la nefropatía diabética como principal causa de insuficiencia renal terminal y la enfermedad cardiovascular aguda, como infarto del miocardio y accidente cerebrovascular, los cuales son la causa de muerte de casi el 80% de la población.

En 1989, Deckert y colaboradores postularon una hipótesis que relaciona la presencia de una disfunción vascular generalizada y microalbuminuria, con la alteración de enzimas involucradas en el metabolismo de componentes aniónicos de la matriz extracelular, y pérdida de estos proteoglicanos asociada a las complicaciones microvasculares en la DM.

Con base en esta evidencia, se evaluó el efecto del tratamiento con glicosaminoglicanos (GAGs) exógenos, principalmente sulodexide (dermatan sulfato + heparan sulfato) demostrando eficacia en el tratamiento de complicaciones vasculares de la diabetes tales como nefropatía diabética (Gambaro y col., 2002; Skrha y col., 1997; Solini y col., 1997), arteriopatía periférica (Velussi y col., 1996), enfermedad coronaria (Gaddi y col., 1996) y retinopatía diabética (Rubby, 2000).

El incremento de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) contribuye al daño renal en modelos experimentales de diabetes, y la administración a largo plazo de heparina y otros glicosaminoglicanos, han mostrado un efecto protector ante el daño oxidativo en diferentes tejidos, incluyendo un efecto protector sobre el daño oxidativo indu-

cido por la adriamicina a nivel cardíaco, hepático y renal (Campo y col., 2005; Lee y col., 2004; Deepa y Varalakshmi, 2003a,b). Sin embargo, el posible efecto antioxidante del sulodexide no ha sido evaluado.

El sulodexide (SUL) es considerado una estrategia terapéutica emergente para el tratamiento de la diabetes, ya que mejora la función vascular renal y disminuye la microalbuminuria, por lo que nos propusimos evaluar el efecto de este compuesto sobre el estado antioxidante en la corteza renal de ratas con diabetes tipo 1.

De manera adicional, los efectos de SUL permiten proponerlo como protector del endotelio vascular. Normaliza la permeabilidad vascular, tiene efecto antitrombótico, fibrinolítico y antiagregante plaquetario, sumado a un efecto antilipémico y antiproliferativo, lo que sugiere su utilidad en el tratamiento de la disfunción endotelial (Kristová y col., 2000; Harenberg, 2000). Sin embargo el efecto directo del sulodexide sobre la reactividad vascular no ha sido evaluado y constituye uno de nuestros objetivos.

El endotelio es considerado un órgano endocrino extenso, y participa en la regulación de funciones vitales, tales como mantenimiento del tono vascular, la permeabilidad selectiva, adhesión y agregación plaquetaria, fibrinólisis y crecimiento tisular. De manera que la alteración de cualquiera de estas funciones puede producir disfunción endotelial (Acosta, 2001; Sthhouwer y col., 2004).

La disfunción endotelial (DE) representa cambios en las propiedades de endotelio, que impiden que se preserve su función. Es decir, que el endotelio pierde su capacidad de modular el comportamiento fisiológico del lecho vascular (Simón y col., 2001).

Diversos estudios han demostrado que la disfunción endotelial es un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, hipertensión e insuficiencia cardíaca, por lo que es importante protegerlo y mantener su integridad funcional (Kristová y col., 2000).

El óxido nítrico (ON), identificado por Furchgott en 1980, es la sustancia vasoactiva más importante del endotelio. Además de su potente acción vasodilatadora, inhibe la agregación plaquetaria, la proliferación y migración del músculo liso (Furchgott, 1980; Moncada y Higgs, 1991). Fisiológicamente se libera ante el estrés de roce que ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared vascular, y la cuantificación de su producción es una manera de determinar indirectamente la función del endotelio.

La evidencia soporta la importancia de la integridad de la pared vascular en la respuesta a la vasodilatación mediada por flujo. En ausencia del glicosaminoglicano ácido hialurónico, disminuye la produc-

ción de ON en respuesta al incremento de flujo en preparaciones de arteria femoral aislada de perro (Mochizuki y col., 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que la heparina (uno de los componentes del sulodexide), produce un efecto vasodilatador directo en anillos de arteria mamaria interna de humanos, e incrementa la producción de ON en cultivo de células endoteliales de arteria carótida de porcino (Li y col., 1996; Tasatargil y col., 2005).

Estos hallazgos, conjuntamente con los efectos farmacológicos conocidos de los GAGs, señalan que los mismos pueden cumplir un papel importante en la disfunción endotelial, y que su administración exógena puede mejorar diversas variables asociados a esta patología.

Se evaluó si el sulodexide (Vessel Due F[®]), que está constituido por GAGs naturales, es capaz de modificar el tono vascular en anillos de aorta de rata y si esta respuesta es modificada en un modelo experimental de diabetes tipo 1, patología asociada a pérdida generalizada de glicosaminoglicanos. Adicionalmente, estudiamos si el efecto protector que ejerce a nivel renal se relaciona con sus acciones a nivel de las enzimas involucradas en el estrés oxidativo.

Materiales y métodos

Como animales de experimentación se utilizaron ratas albinas, macho, de la cepa Sprague-Dawley, de 6 a 7 semanas de edad, con peso comprendido entre 200-220 g, provenientes del bioterio de la Escuela de Medicina José María Vargas, UCV, Caracas, las cuales fueron mantenidas con períodos alternos de luz y oscuridad, permitiéndole libre acceso al agua y a la comida.

Las ratas fueron asignadas al azar a dos grupos, un grupo control y otro al que se le indujo diabetes. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996)

Inducción a la diabetes

La diabetes fue inducida mediante la administración de una inyección única de estreptozotocina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), 40 mg/Kg de peso, en la vena caudal. La inducción de la diabetes fue confirmada a los 2 y 7 días posteriores a la administración de estreptozotocina, mediante la determinación de los niveles sanguíneos de glucosa utilizando un método enzimático (Glucosa HK Reagent, Bayer). Los animales no recibieron insulina durante el experimento.

El SUL fue administrado 5 días a la semana (lunes a viernes). Durante el período de seguimiento, a

los animales se les determinó mensualmente el peso, la presión arterial y los niveles de glucosa sanguínea, y pasados los 3 meses de tratamiento fueron sacrificados para realizar los análisis pertinentes de acuerdo a los siguientes grupos experimentales: Control: solución salina s.c.; STZ: estreptozotocina + solución salina s.c.; STZ + Sulodexide: estreptozotocina + 15 mg/Kg de peso/día de sulodexide por vía s.c.

Al finalizar el tratamiento se tomaron muestras para la determinación de la excreción de albúmina en orina y posteriormente los animales fueron sacrificados y los riñones extraídos para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes. Otro grupo de animales fue sacrificado al finalizar el período de tratamiento para extraer las arterias y realizar los estudios correspondientes.

DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

El registro de la presión arterial, se realizó en ratas conscientes, utilizando un método no invasivo, mediante el uso de un pletismógrafo digital de cola (LE 5000, LETICA Scientific Instrument, Barcelona, España). Las ratas fueron calentadas colocando la jaula que las contiene en una estufa (Memmert, 854 Schwabach, Western Germany) a 42 °C (Sobin, 1938), durante 15 minutos para producir la vasodilatación de los vasos periféricos. Posteriormente, cada rata fue colocada en un cepo con el fin de inmovilizarlas, y mediante el uso de un transductor de presión arterial y frecuencia cardíaca se procedió a la cuantificación de la presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD) y la frecuencia cardíaca. Se calculó la PAM mediante la siguiente fórmula: $PAM = PAD + 1/3 (PAS - PAD)$.

DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA A1c (HbA1c)

La hemoglobina glicosilada A1c fue determinada utilizando un kit comercial (DCA 2000[®], Bayer).

DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA

La glucosa fue determinada en muestras de sangre mediante una prueba enzimática utilizando un kit comercial (Glucosa HK Reagent, Bayer).

DETERMINACIÓN DEL FUNCIONALISMO RENAL

Determinación de la excreción de proteínas y albúmina en orina. Los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas para obtener orina de 24 horas. La determinación de la albuminuria se realizó utilizando un kit comercial (DCA 2000[®], Bayer).

Vasoactividad en anillos de Aorta

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Nembutal sódico (10 mg/Kg). Se practicó una toratocómia ventral, para obtener un fragmento de la aorta torácica, la cual fue cuidadosamente disecada y cortada en anillos de 1 cm de longitud. Los anillos se fijaron a un baño para órgano aislado (14 ml de capacidad) mediante estribos de acero inoxidable y la tensión muscular fue medida con un transductor isométrico (LETICA TRI 110) conectado a un polígrafo (LETICA modelo 4006). La preparación fue mantenida en una solución de Krebs Henseleit (composición mM: NaCl 118; KCl 4,8; CaCl₂·7H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄·7H₂O 1,2; NaHCO₃ 2,5; glucosa 2), burbujeada continuamente con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂, a pH 7,4 y una temperatura de 37° C. La preparación se dejó estabilizar por una hora y las drogas se añadieron directamente al baño con una microjeringa Hamilton. Para evaluar la respuesta de relajación vascular, los anillos fueron precontraídos con fenilefrina (agonista a adrenérgico) a una dosis del 80% de la respuesta máxima (Furchgott y Zawadzki, 1980).

Procesamiento de las Aortas y observación histológica al Microscopio de luz

Se recibieron tres grupos de especímenes identificados como control, diabetes (STZ), diabetes + sulodexide (STZ+SUL). Los segmentos de cortes transversales de aortas fueron deshidratados, e incluidos en parafina previa impregnación con solventes de la parafina para realizar las secciones para el estudio histológico al microscopio de luz. Los cortes de los bloques de parafina se realizaron con un microtomo obteniéndose secciones de 5 a 7 micras de grosor de cada segmento arterial, los cuales fueron montados para su tinción. Las secciones histológicas fueron teñidas con: coloración de hematoxilina-eosina de Mayer, coloraciones específicas para evidenciar fibras colágenas y elásticas con tricrómico de Gomori y de Verhoeff, respectivamente. Para el estudio histopatológico se contaron las láminas elásticas y se describieron los cambios observados en las tres capas arteriales y la luz arterial.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA (CAT)

La actividad de la CAT fue determinada empleando una modificación del método de Aebi (1984). Para ello, se añadió 25 µL del homogenizado de corteza renal a 725 µL de la mezcla de incubación (10 mM H₂O₂ en buffer fosfato 10 mM a pH 7) y se monitoreó el cambio de absorbancia a 240 nm a los 0, 60, 120 y 180 segundos, utilizando la constante de

reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT ($k = (1/t) (2,3 \times \log A_1/A_2)$), donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A₁ y A₂ son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂. Los resultados se expresaron en actividad específica.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA TOTAL (SOD)

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) a formazán a 595 nm, por los aniones superóxido generados por el sistema de la xantina oxidasa (Oberley y col., 1984). Para ello, se mezclaron 166 µL de la mezcla de incubación (xantina 0,3 mM, EDTA 0,6 mM, NBT 150mM, albúmina 0,1% y NaHCO₃ 400 mM) con 33 µL del homogeneizado de la corteza renal. La reacción se inició con la adición de 10 µL de la enzima xantina oxidasa. Los tubos se incubaron durante 30 minutos, seguidos de la adición de 66 µL CuCl₂ 2H₂O 0,8 mM que detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron como actividad específica. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la formación de los cristales de formazán.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico de las diferencias fue realizado mediante la utilización de la Prueba de "t" de Student o el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Bonferroni, un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. El análisis de los resultados y la elaboración de los gráficos se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism versión 5.1.

Resultados

La Tabla I muestra los valores del peso, la glicemia y el volumen urinario, los valores de HbA1c y de presión arterial media de los grupos estudiados. Los grupos a los cuales se le indujo diabetes muestran un incremento significativo en la glicemia, la HbA1c y el volumen urinario excretado en 24 h., así como un menor peso comparado con el grupo control a los 3 meses de tratamiento. No se observa diferencia significativa en los valores de presión arterial media entre los diferentes grupos de tratamiento.

La inducción de diabetes con STZ produce un incremento significativo de la excreción urinaria de albúmina con respecto al grupo control ($C = 0,64 \pm 0,08$; $STZ = 7,69 \pm 1,4$ mg/24hr). El tratamiento durante 3 meses con sulodexide previene parcialmen-

Tabla I
Parámetros evaluados a los tres meses de tratamiento

	Control	STZ	STZ + SUL
Peso (mg)	383,1 ± 3,7	283 ± 7,1 (*)	294,8 ± 7,7 (*)
Glicemia (mg/dl)	95 ± 7,6	632 ± 3,7 (*)	666 ± 8,8 (*)
Volumen urinario (ml)	17,4 ± 0,4	109,3 ± 12,9 (*)	117,8 ± 6,9 (*)
HbA1c	3,0 ± 0,01	10,6 ± 0,3(*)	10,48 ± 0,3(*)
PAM (mm Hg)	118,8 ± 4,3	117,2 ± 2,7 ^{NS}	106,6 ± 1,8 ^{NS}

Los datos son la media ± EEM de 8-10 ratas. *p<0,01 vs control, NS = no significativo vs control.

te este incremento (STZ+SUL=3,0 ± 0,30 mg/24hr), disminuyendo la excreción de albúmina un 60% con respecto al grupo diabético no tratado (Figura 1).

En la Figura 2, panel izquierdo se muestra la actividad de enzima catalasa expresada en K/mg de proteínas. La inducción de diabetes disminuye significativamente la actividad enzimática (C=0,82±0,01 vs STZ=0,18±0,04), el pretratamiento durante tres meses con sulodexide previene la disminución de la actividad enzimática inducida por la diabetes (SUL=0,71±0,08). La actividad de la superóxido dismutasa (SOD), panel derecho, también es disminuida por la inducción de la diabetes (C=1±0,08 vs STZ=0,6±0,1) y esta disminución fue prevenida por el pretratamiento con sulodexide (SUL=0,96±0,3).

En la Tabla II se muestra, el porcentaje de relajación de la aorta torácica previamente contraída con noradrenalina en respuesta a la administración de acetilcolina (ACh) a concentraciones de 10⁻⁷, 3x10⁻⁷, 10⁻⁶ y 3x10⁻⁶ M en los diferentes grupos de tratamiento. El grupo de ratas diabéticas sin tratamiento, mostró una capacidad de relajación de la aorta significativamente disminuida al compararla con el grupo control. Mientras que el grupo de animales diabéticos tratados con sulodexide presenta una capacidad de relajación similar al grupo control. Igualmente se muestra la capacidad de relajación de la aorta torácica en respuesta a la administración de nitroprusiato de sodio (10⁻⁸, 10⁻⁷ y 10⁻⁶ M), un conocido donador de óxido nítrico. En estas condiciones, no hubo diferencia estadísticamente significativa en la relajación de la aorta en los diferentes grupos de tratamiento.

El estudio histológico (Figura 3) del grupo control muestra una pared arterial compuesta de tres capas: íntima, media y adventicia de apariencia normal, y con luz permeable. En la aorta del grupo de animales diabéticos (STZ) se observa la superficie arterial hemorrágica con alteraciones estructurales, especialmente en endotelio y adventicia. Presencia de trombos oclusivos en la luz arterial. El endotelio con ligero

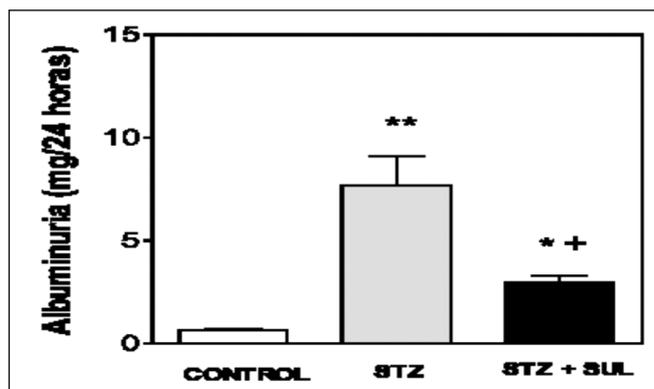


Figura 1. Excreción urinaria de albúmina en 24 horas en las ratas control, diabéticas (STZ) y diabéticas tratadas con sulodexide (STZ + SUL). Los datos son la media ± EEM de 6-10 ratas. *p<0,05; **p<0,01 vs control y +p<0,01 al comparar el grupo STZ + SUL vs STZ.

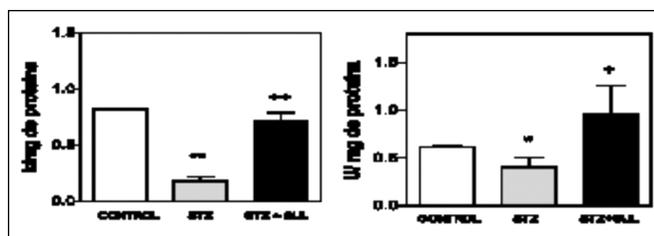


Figura 2. Actividad de la catalasa (panel izquierdo) y de la superóxido dismutasa (panel derecho) en la corteza renal de ratas controles (C), diabéticas (STZ) y diabéticas pretratadas con sulodexide (STZ+SUL). Los datos se representan como la media ± EEM de 6-8 ratas *p<0,05 **p<0,001 vs control. +p<0,05 ++p<0,01 vs STZ.

edema, disrupción focal y adhesión de plaquetas. Engrosamiento de la adventicia por fibrosis, áreas de hemorragia y presencia de un infiltrado inflamatorio monocelular abundante dispuesto principalmente alrededor de la vasa-vasorum, donde observamos engrosamiento de la adventicia. En el grupo de animales diabéticos tratados con sulodexide (STZ-SUL), la pared aórtica no presenta cambios estructurales y la luz es permeable. Las fibras elásticas ligeramente elongadas con preservación de las fibras musculares y la sustancia fundamental. En la adventicia se observaron escasas células mononucleares.

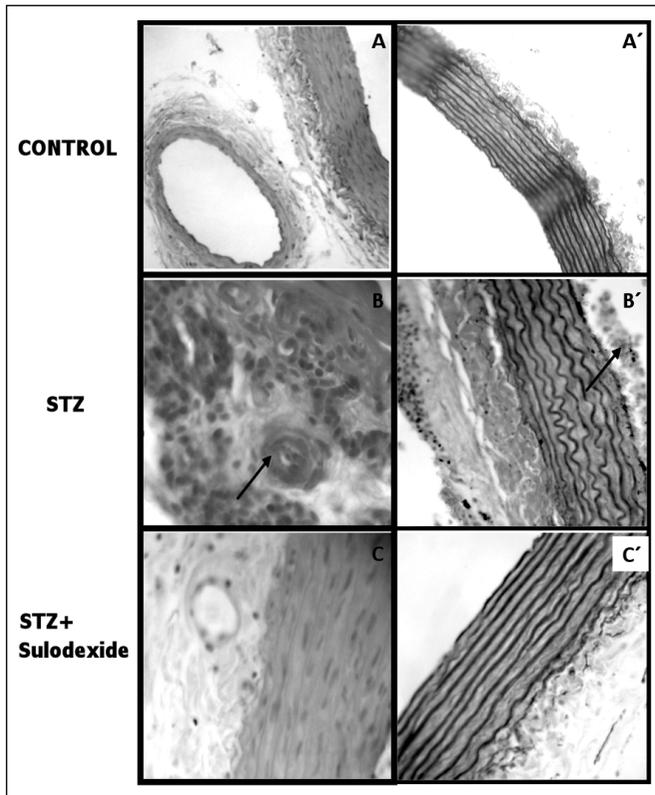


Figura 3. Panel izquierdo: corte histológico, coloración hematoxilina –eosina (H-e) y panel derecho coloración tricrómico. Control (A y A'): Pared aórtica, intima media, adventicia y *vasa vasorum* normales. STZ (B y B'): Infiltrado inflamatorio, *vasa vasorum* engrosado (flecha en B), presencia de trombos (flecha en B') y lesiones en la adventicia. STZ+ SUL: Pared aórtica sin cambios estructurales evidentes, preservación de las fibras musculares, escasas células mononucleares en la adventicia.

Discusión

Los glicosaminoglicanos (GAGs), principalmente el heparán sulfato son sintetizados en las células endoteliales y mesangiales, y después de un proceso de sulfatación a nivel del aparato de Golgi, son incorporados en la matriz extracelular de glomérulo y de las grandes arterias donde contribuyen a mantener la integridad estructural de la membrana basal y de la pared vascular (Gallager y col., 1986).

En la diabetes se ha reportado una reducción generalizada de las cargas negativas de la matriz extracelular y de las membranas plasmáticas, asociada a disminución del contenido de heparán sulfato o a cambios en su grado de sulfatación (Wu y col., 1987; Deckert y col., 1992; Jensen, 1997; Lewis y Xu, 2008). Esta alteración en la carga de la membrana basal, se traduciría en la pérdida de selectividad por carga y facilitaría una eliminación incrementada de proteínas en la orina (Deckert y col., 1992; Jensen, 1997).

Así en modelos experimentales de diabetes en ratas y en ratones, se ha encontrado una disminución en la síntesis de proteoglicanos en el glomérulo y disminución del contenido de proteoglicanos unidos a heparán sulfato en la membrana basal (Kanwar y col., 1983; Rohrbach y col., 1982). Igualmente se ha reportado que el contenido de GAGs está disminuido en los riñones y en la intima de las aortas obtenidas por autopsia en pacientes diabéticos (Parthasarathy

Tabla II

Porcentaje de relajación de la aorta torácica previamente contraída con fenilefrina en respuesta a la administración de acetilcolina o nitroprusiato de sodio

Relajación de la aorta torácica en respuesta a la acetilcolina			
Concentración (M)	Control	STZ	STZ + SUL
1×10^{-7}	12,9±0,9	8,5±2,9	10,6±2,2
3×10^{-7}	29,6±1,8	21,3±3,0 (*)	29,7±2,0
1×10^{-6}	47,6±2,2	30,7±3,2 (*)	47,3±2,2
3×10^{-6}	65,9±2,0	44,6±5,2 (*)	69,9±4,2

Relajación de la aorta torácica en respuesta al nitroprusiato de sodio			
Concentración (M)	Control	STZ	STZ + SUL
1×10^{-8}	56,0±4,1	53,0±3,2	62,1±2,1
1×10^{-7}	75,2±5,0	70,0±4,8	73,1±3,9
1×10^{-6}	100,0±6,8	93,3±8,0	99,2±4,1

Los datos se representan como la media ± EEM de 6-8 ratas *p<0,01 vs control

y Spiro, 1982; Wasty y col., 1993), sugiriendo que las alteraciones del metabolismo del heparán sulfato no están restringida al riñón y pueden participar en patogénesis de otras complicaciones de la diabetes.

Se ha demostrado, que las alteraciones en el metabolismo de los GAGs, producidas en un modelo de diabetes experimental en ratas, son susceptibles de ser modificadas mediante la administración exógena de los mismos, con la consecuente restauración del funcionamiento normal del riñón (Gambaro y col., 1992; 1994).

Nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura, ya que la administración de sulodexide por vía subcutánea durante tres meses, previene el incremento en la excreción renal de albúmina en este modelo experimental, coincidiendo con lo reportado previamente en la literatura (Gambaro y col., 1992; 1994), y se corresponden con el efecto de disminución de la excreción renal de albúmina demostrado en pacientes con diabetes mellitus (Solini y col., 1997; Myrup y col., 1995; Tamsma y col., 1996; Velussi y col., 1996, Gambaro y col., 2002; Achour y col., 2005).

En pacientes con nefropatía diabética, se ha demostrado una correlación entre la albuminuria y el contenido de heparán sulfato de la membrana basal del glomérulo (Tamsma y col., 1994). Igualmente, se ha observado, una marcada reducción de la micro o macroalbuminuria en pacientes diabéticos que han sido tratados con GAGs (Solini y col., 1994; Myrup y col., 1995; Tamsma y col., 1996; Velussi y col., 1996).

Estos hallazgos señalan que los GAGs pueden cumplir un papel importante en la fisiopatología de la nefropatía diabética, y que un metabolismo anormal de los GAGs podría ser la causa de esta patología (Gambaro y Biagio 1996; Gambaro y col., 1998).

El mecanismo por el cual los GAGs ejercen este efecto protector en la nefropatía diabética no está completamente dilucidado. Inicialmente se propuso que su efecto se limitaría a restituir la permeabilidad selectividad glomerular al reponer las cargas negativas, disminuyendo de esta forma la excreción de albúmina en orina y recuperando la funcionalidad (Deckert y col., 1993; Gambaro y col., 1998; Gambaro y van der Woude, 2000). Sin embargo actualmente se conoce que los GAGs pueden modular la síntesis proteica en la matriz extracelular, efecto que puede contribuir a su utilidad terapéutica.

La administración de heparina de bajo peso molecular y dermatán sulfato, previene el engrosamiento de la membrana basal, la reducción de cargas aniónicas y el inicio de la albuminuria en ratas con diabetes inducida mediante la administración de es-

treptozotocina (Gambaro y col., 1992). Adicionalmente se ha demostrado que la administración la heparina disminuye la sobreexpresión de colágeno, posiblemente interfiriendo la vía mediada por el TGF β 1 que está activada en la nefropatía diabética (Gambaro y col., 1994; Ceol y col., 2000). Recientemente Lewis y Xu (2008) demostraron que los GAGs inhiben la enzima heparanasa, que es estimulada por la hiperglicemia, previniendo de esta manera la degradación del heparán sulfato. En conjunto estos efectos contribuyen a que los GAGs puedan prevenir las alteraciones estructurales y funcionales, principalmente mesangiales, que se presentan en la nefropatía diabética.

El incremento de estrés oxidativo contribuye a las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes, principalmente las complicaciones renales (Verzola y col., 2005). De manera, que intervenciones que restituyan la actividad de las enzimas involucradas en el proceso oxidativo, son de utilidad para prevenir las complicaciones asociadas a esta patología (Muzykantov y col., 2001).

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento crónico con sulodexide impide la disminución del estado antioxidante en la corteza renal de la rata, evidenciado por el efecto beneficioso sobre la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa. Demostramos que el sulodexide presenta un efecto antioxidante similar al reportado para otros GAGs en otras estructuras (Campo y col., 2005; Lee y col., 2004; Deepa y Varalakshmi 2003a,b), que podría contribuir a su efecto protector ante el daño oxidativo renal producido por las especies reactivas de oxígeno en la diabetes.

Sin embargo, la pérdida de glicosaminoglicanos que se observa en la diabetes no se circunscribe exclusivamente al riñón. La hipótesis de Steno (Deckert y col., 1989), sostiene que las alteraciones renales son reflejo de un proceso vascular generalizado que afecta glomérulo, retina y la íntima de los grandes vasos simultáneamente.

Nuestros resultados soportan esta posibilidad, ya que el pretratamiento con sulodexide es capaz de prevenir la pérdida de la respuesta vasodilatadora inducida por la diabetes en este modelo experimental. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Kristová y col. (2008), quienes demostraron que el pretratamiento con sulodexide previene la alteración de la relajación por la administración de acetilcolina inducida por la diabetes, en la aorta y la arteria mesentérica en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, sugiriendo un posible papel protector del endotelio.

Adicional aportamos evidencia que la reducción en la capacidad de relajación inducida por la diabetes parece ser el resultado de deficiencia en la producción de óxido nítrico (ON), ya que no se observaron diferencias entre los diferentes grupos utilizando nitroprusiato de sodio. Indicando que el efecto protector del endotelio ejercido por el sulodexide puede estar relacionado con la preservación de la acción del ON.

Nuestro grupo, previamente ha demostrado que el sulodexide estimula la actividad de la enzima sintasa del ON en la corteza renal de ratas controles y con diabetes tipo 1 (Mathison y col., 2008), mientras que Targasil y col. (2005) que el ON tiene un papel en la vasodilatación producida por la heparina en la arteria mamaria interna de humanos. Por otra parte, se ha demostrado que la degradación del ácido hialurónico en el glicocalix induce la pérdida de relajación ante el estrés mediado por el flujo en la arteria femoral aislada de perros y disminuye la liberación de ON (Mochizuki y col., 2003), indicando una relación entre las funciones mediadas por ON y los GAGs.

El estudio histológico pone en evidencia el efecto protector del tratamiento con sulodexide sobre los cambios morfológicos producidos por la diabetes en los vasos arteriales, ya que produce la reversión completa de las alteraciones estructurales en las arterias de los animales diabéticos. Previamente se ha reportado un efecto antiproliferativo de la neointima en modelos *in vitro* (Park y col., 1997), sin embargo por primera vez se demuestra la correlación entre los hallazgos histológicos y funcionales a nivel vascular, de manera similar a lo reportado en riñón (Gambaro y col., 2002). A este efecto puede estar contribuyendo la disminución del fibrinógeno plasmático y la prolongación del tiempo de coagulación en estos animales, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Park y col., 1997; Izaguirre y Zaldivar, 2003).

Aun cuando el mecanismo de acción del sulodexide y otros GAGs no está totalmente esclarecido, nuestros resultados demuestran que sus efectos antioxidantes y sobre la producción de óxido nítrico contribuyen en su acción para prevenir las complicaciones renales y la disfunción endotelial presentes en la diabetes.

Agradecimientos

Los autores expresamos nuestro agradecimiento al personal del Bioterio de la Escuela de Medicina José María Vargas. A laboratorios CLINIFAR, la MSc. Zaida Quero y a la Dra. Hungría Fernández. A Laboratorios ELMOR S.A por el suministro del sulodexide. Subvencionado por Misión Ciencia (FONACIT-MPPCT) N° 2007001585 y CDCH PG 09-11-5102-2007.

Referencias bibliográficas

- Acosta-Martínez J. 2001. Protección cardiovascular integral. En Protección cardiovascular integral. Capítulo 1. pp. 3-31. Editorial Medito, Caracas, Venezuela
- Achour A, Kacem M, Dibej K, Skhiri H, Bouraoui S, El May M. 2005. One year course of oral sulodexide in the management of diabetic nephropathy. *J Nephrol* 18 (5): 568-574.
- Braundwald E, Wilson J. 2002. Diabetes mellitus. En: Harrison Principios de Medicina Interna XV ed. Braundwald E, Wilson J, Martin J, Fauci A y Kasper D, editores. Vol II, Editorial Interamericana McGraw-Hill, Nueva York, EE.UU.
- Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Campo S, Ferlazzo AM, Sama D, Calatroni A. 2005. Purified human plasma glycosaminoglycans limit oxidative injury induced by iron plus ascorbate in skin fibroblast culture. *Toxicol in vitro* 19(5):561-572.
- Ceol M, Gambaro G, Sauer U, Baggio B, Anglani F, Fiorino M, Facchin S, Bordin L, Weigert C, Nerlich A, Schleicher E. 2000. Glycosaminoglycans therapy prevents TGF- β 1 overexpression and pathologic changes in renal tissue of long-term diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 2324-2336.
- Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Vidal P, Norgaard K, Andreassen HB, Felt-Rasmussen B. 1993. Size and charge selectivity of glomerular filtration in type 1 (insulin-dependent) diabetes with and without albuminuria. *Diabetologia* 36:244-251.
- Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Borch-Johnsen K, Rasmussen B, Jensen T. 1992. Microalbuminuria: Implications for micro-and macrovascular diseases. *Diabetes Care* 15 (9): 1181-1191.
- Deckert T, Felt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. 1989. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypotesis. *Diabetologia*. 32: 219-226.
- Deepa PR, Varalakshmi P. 2003a. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interant* 146(2):201-210.
- Deepa PR, Varalakshmi P. 2003b. The cytoprotective role of a low-molecular-weight heparin fragments studied in an experimental model of glomerulotoxicity. *Eur J Pharmacol* 478(2-3):199-205.
- De Islas, Revilla M. 1999. Epidemiología de la Diabetes Mellitus En: Diabetes Mellitus. Islas S, Lifshitz, A. editores. Cap 1 pp: 3. 2da edición. McGraw-Hill Interamericana México.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Gaddi A, Galetti C, Illuminati B, Nascetti S. 1996. Meta-analysis of some results of clinical trials on sulodexide therapy in peripheral occlusive arterial disease. *J Int Med Res* 24(5):389-406.

- Gallagher J, Lyon M, Steward W. 1986. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem J* 236: 313-325.
- Gambaro G, Kinalska I, Oksa A, Pont uch P, Hertlová M. 2002. Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients: The Di.N.A.S. randomized trial. *J. Am Soc Nephrol* 13 (6): 1615-1625.
- Gambaro G, Skrha, Ceriello A. 1998. Glycosaminoglycans therapy for the long-term diabetic complications. *Diabetologia*. 41: 975-979.
- Gambaro G, Cavazzana A, Luzi P, Piccoli A, Borsatti A, Crepaldi G, Marchi E, Venturini AP, Baggio B. 1992. Glycosaminoglycans prevents morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int*. 42: 285-291.
- Gambaro G, Venturini A, Noonam D, Fries W, Re G, Garbisa S, Milanese C, Pesarini A, Borsatti A, Marchi E, Bruno B. 1994. Treatment with a glycosaminoglycans formulation ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 46: 797-806.
- Gambaro G, van der Woude F. 2000. Glycosaminoglycans: use in treatment of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 11: 359-368.
- Gambaro G, Baggio B. 1996. Glycosaminoglycans: a new paradigm in the prevention of proteinuria and progression of glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 11: 762-764.
- Harenber J. 2000. Vascular complications of diabetes and treatment with sulodexide. Therapy perspectives for rational use and disease management. «Diabetic microangiopathy and sulodexide» 2° International Congress of the Central European Vascular Forum. Rome.
- Izaguirre R, Zaldívar H. 2003. El fibrinógeno como factor de riesgo cardiovascular. *Arch Cardiol Mex*, 73(1):7-10.
- Jensen T. 1997. Pathogenesis of diabetic vascular disease: evidence for the role of reduced heparan sulfate proteoglycan. *Diabetes* 46 (S2): S98-S100.
- Kanwar Y, Rosenzweig L, Linker A, Jakubowski M. 1983 Decreased the novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: Biochemical and autoradiographic evidences: *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2272-2275.
- Kristova V, Liskova S, Sotnikova R, Vojtko R, Kurtansky A. 2008. Sulodexide improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Physiol Rev* 57: 491-494.
- Kristová V, Kriska M, Babál P, Djibril MN, Slámová J, Kurtansky A. 2000. Evaluation of endothelium-protective effects of drugs in experimental models of endothelial damage. *Physiol Res* 49: 123-28.
- Lee JY, Lee SH, Kim HJ, Ha JM, Lee SH, Lee JH, Ha BJ. 2004. The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCl4-induced oxidative stress of subcellular level. *Arch Pharm res* 27(3): 340-345.
- Lewis E, Xu X. 2008. Abnormal glomerular permeability characteristic in diabetic nephropathy. Implications for the therapeutic use of low-molecular weight heparin. *Diabetes Care* 31 (S2): S202-S206.
- Li J, Hajarizadeh H, La Rosa C, Rohrer M, Vander Salm T, Cutler B. 1996. Heparin and protamine stimulate the production of nitric oxide. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 37(5): 445-52.
- Mathison Y, Garrido MR, Israel A, Quero Z, Fernández H. 2008. Efecto del glicosaminoglicano sulodexide sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico en la corteza renal de ratas con diabetes tipo 1. *Revista Latinoamericana de Hipertensión* 3(6): 182-188.
- Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan J, Kajiya F. 2003. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H722-H726.
- Moncada S, Higgs E. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21(4):361-74.
- Muzykantov V. 2001. Targeting superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Controlled Release* 71: 1-21.
- Myrup B, Hansen P, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A, Feldt-Rasmussen B, Gram J, Klufft C, Jespersen J, Deckert T. 1995. Effect of low-dose of heparin on urinary excretion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 345: 421-422.
- NIH Guide for the care and use of laboratory animals. 1996. *NIH Guide* 25 (28): 1-111.
- Park HY, Kang S, Kim GY, Jang Y, Know HM, Shim WH, Cho SY, Cho SH. 1997. Inhibition of neointimal proliferation of rat carotic artery by sulodexide. *JKMS* 12: 210-214.
- Parthasarathy N, Spiro R. 1982. Effect of diabetes on the glycosaminoglycans component of the human glomerular basement membrane. *Diabetes* 31: 738-741.
- Rohrbach D, Hassel J, Kleinman H, Martin G. 1982. Alterations in the basement membrane (heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* 31: 185-188.
- Rubby F. 2000. The effects of sulodexide on diabetic retinopathy. Therapy perspectives for rational use and disease management. Diabetic microangiopathy and sulodexide. 2° International Congress Central European Vascular Forum. Rome.
- Simón A, Castro A, Kaski J. 2001. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Cubana Med* 40(3): 212-22.
- Skrha J, Perisicovca J, **Pontuch** P, Oksa A. 1997. Glycosaminoglycans, sulodexide decreases albuminuria in diabetic patients. *Diab Res Clin Pract* 38: 25-31.
- Sobin S. 1983. Accuracy of indirect determination of blood pressure in rat: relation to temperature of plethysmograph and width of cuff. *AM J Physiol* 146: 179-182.
- Solini A, Vergnani L, Ricci F, Crepaldi G. 1997. Glycosaminoglycans delay the progression of nephropathy in NIDDM. *Diabetes Care* 29 (5): 819-823.

- Solini A, Carraro A, Barzon I, Crepaldi G. 1994. Therapy with glycosaminoglycans lower albumin excretion rate in non-insulin dependent diabetic patients with macroalbuminuria. *Diab Nutr Metab* 7: 304-307.
- Stehouwer C, Henry R, Dekker J, Nijpels G, Heine R, Bouter L. 2004. Microalbuminuria is associated with impaired brachial artery, flow-mediated vasodilation in the elderly individuals without and with diabetes: further evidence for a link between microalbuminuria and endothelial dysfunction-The Hoorn Study. *Kidney Int* 66 (S92): S42-S44.
- Tasatargil A, Golbasi I, Sadan G, Karasu E. 2005. Unfractionated heparin produces vasodilatory action on human internal mammary artery by endothelium-dependent mechanisms. *J Cardiovasc. Pharmacol* 45(2): 114-9.
- Tamsma J, van der Woude Y, Lemkes H. 1996. Effect of sulphated glycosaminoglycans on albuminuria in patients with overt diabetic (type 1) nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 11(1):182-185.
- Tamsma J, Van der Born J, Brujin J, Assmann K, Weening J, Berden J, Wieslander J, Schrama E, Hermans J, Veerkamp JH. 1994. Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: decrease of heparan sulphate in the glomerular basement membrane. *Diabetologia*, 37: 313-320.
- Velussi M, Cernigoi A, Dapas F, De Monte A. 1996. Glycosaminoglycans oral therapy reduces microalbuminuria, blood fibrinogen levels and limb arteriopathy clinical signs in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diab Nutr Metab* 9:53-58.
- Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, Berruti V, Gandolfo MT, Garobotto G, Deferrari G. 2004. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Nephrol* 15: S85-S87.
- Wasty F, Alavi MZ, Moore S. 1993. Distribution of glycosaminoglycans in the intima of human aortas: changes in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Diabetologia*. 36(4):316-22.