

Efecto de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio

Morales Martín AI¹, Vicente-Sánchez¹ C, Santiago Sandoval² JM^a, *Fernández Tagarro² M, López-Novoa¹ JM y Pérez-Barriocanal¹ F

Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica. ¹Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca.

²Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario de Salamanca.

Recibido 28 de Julio de 2003 / Aceptado 23 de Enero de 2004

Resumen: El incremento en la producción anual de cadmio ha favorecido que la incidencia de la intoxicación crónica por este elemento haya aumentado en los últimos años. El estrés oxidativo es uno de los mecanismos implicados en la generación del efecto tóxico, manifestándose, entre otras patologías, por una disfunción y lesión renal. La quercetina, un flavonoide muy abundante en la dieta mediterránea, es un potente antioxidante y un buen quelante de metales. Nuestro objetivo fue estudiar si la administración de quercetina pudiera prevenir la aparición de los procesos nefrotóxicos asociados a la exposición crónica al cadmio. Los experimentos se realizaron con ratas Wistar (200g), incluidas en tres grupos experimentales: 1) ratas a las que se administró cadmio (1,2 mg/kg/día, s.c.) cinco veces por semana, durante nueve semanas, 2) ratas a las cuales se les administró quercetina (50 mg/kg/día, i.p.) cinco veces por semana, empezando en la cuarta semana y 3) ratas a las que se administró cadmio y quercetina. La lesión renal se evaluó midiendo proteinuria, microalbuminuria y glucosuria, así como la excreción de enzimas urinarias N-acetil-beta-D-glucosaminidasa, fosfatasa alcalina y gamma-glutamyl-transpeptidasa. Las muestras de plasma se utilizaron para la determinación de creatinina y nitrógeno ureico plasmático, así como dialdehído malónico, como índice de peroxidación lipídica y antioxidantes totales en plasma. En riñón se midió la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y de la glutatión reductasa. Nuestros resultados mostraron que la administración de cadmio durante 9 semanas produjo un incremento en los valores de flujo urinario, proteinuria, microalbuminuria y glucosuria. El tratamiento con cadmio incluso incrementó la creatinina sérica y el nitrógeno uréico plasmático y elevó drásticamente la actividad de enzimas urinarias. Finalmente el aclaramiento de creatinina disminuyó como consecuencia de la disfunción renal. La administración de quercetina con cadmio mostró una clara mejora en la función renal y revirtió dichas alteraciones. La peroxidación lipídica se incrementó en las ratas tratadas con cadmio y este incremento fue revertido por la administración de quercetina. La concentración de antioxidantes totales en plasma, fue más alta en el grupo que recibió cadmio y quercetina. El grupo tratado con cadmio mostró una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa

y la glutatión reductasa en riñón, sin embargo en el grupo al que se administró también quercetina este descenso fue significativamente menor. Este estudio revela que la quercetina tiene un efecto protector frente a la nefrotoxicidad producida por cadmio y que su propiedad antioxidante parece ser la responsable de esta acción protectora.

Palabras clave: cadmio, quercetina, nefrotoxicidad, estrés oxidativo, antioxidantes.

Abstract: Effect of quercetin in cadmium-induced nephrotoxicity. Increased levels of cadmium in the environment have augmented the incidence of chronic cadmium-induced intoxication over the past few years. Oxidative stress is one of the mechanisms involved in cadmium-toxicity which manifests itself as renal injury, leading to renal dysfunction. Quercetin, one of the most abundant flavonoids present in the mediterranean diet, is a strong antioxidant and a good chelator of metals. Our aim was to study whether the administration of quercetin might offer protection against cadmium nephrotoxicity. Experiments were carried out in male Wistar rats weighing approximately 200 g. The study consisted of three experimental groups: 1) rats that received cadmium (1,2 mg/kg body weight, s.c.), 5 times/week, up to week 9; 2) rats that received quercetin (50 mg/kg body weight, i.p.), 5 times/week beginning from week 4; and 3) rats that received both cadmium and quercetin. Renal toxicity was evaluated by measuring proteins, microalbumin and glucose in urine, as well as urinary excretion of the following enzymes: N-acetyl-b-D-glucosaminidase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl-transpeptidase. Plasma concentrations of creatinine and blood urea nitrogen were determined. Malondialdehyde concentration in plasma was used as an index of lipid peroxidation. Total antioxidants found in plasma were also measured. Kidney samples were used to analyze changes in the activity of the antioxidative enzymes, superoxide dismutase and glutathione-reductase. Our results show that the administration of cadmium over a nine-week period induced an increase in urinary flow, as well as in protein, microalbumin and glucose concentration in urine. Treatment with cadmium also increased serum creatinine and blood urea nitrogen, and drastically elevated the presence of enzyme activity in urine. Finally, as a result of functional renal damage, creatinine clearance was reduced. Animals that received both cadmium and quercetin showed a clear improvement in renal function, and all of the measured parameters remained unaltered. Renal lipid peroxidation was increased

Correspondencia: Ana Isabel Morales Martín. Departamento de Fisiología y Farmacología (Toxicología). Edificio Departamental. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca (Spain). Teléfono: 923 294472. Fax: 923 294669. E-mail: amorales@usal.es.

in rats receiving cadmium alone; this increase was prevented by the administration of quercetin. The concentration of antioxidants in plasma was higher in the group that received cadmium and quercetin. Both the superoxide dismutase and glutathione-reductase activity were found to be lower in kidney in the group treated with cadmium and quercetin. This study demonstrates that quercetin has a protective effect on cadmium-induced nephrotoxicity and that its strong antioxidant activity could be the property responsible for this finding.

Key words: cadmium, quercetin, nephrotoxicity, oxidative stress, antioxidant.

Introducción

El cadmio es un elemento no esencial para los sistemas biológicos, que se encuentra presente como contaminante en los alimentos, el agua o el aire. El incremento en la producción anual de este elemento, su presencia en productos tales como fertilizantes, residuos de baterías y pilas eléctricas y en el humo del tabaco, han hecho que los efectos dañinos sobre la población general, expuesta a bajas concentraciones, hayan aumentado [1].

Una vez absorbido por los pulmones o el tracto gastrointestinal, el cadmio es transportado en sangre unido a albúmina y a glóbulos rojos. En el hígado el cadmio induce la síntesis de proteínas de bajo peso molecular ricas en azufre (metalotioneínas) a las que se une formando un complejo (Cd-MT) que es liberado a la circulación sistémica, transportado por la sangre y filtrado a través del glomérulo a la orina primaria. Seguidamente es reabsorbido por las células tubulares proximales [2]. Las lisozimas de estas células tubulares degradan rápidamente el complejo y liberan cadmio libre al citoplasma [3, 4], el cual se une a metalotioneínas generadas por las propias células tubulares [5]. Si la cantidad de cadmio presente es grande, la producción de metalotioneínas es insuficiente y se origina un exceso de cadmio intracelular que afecta a orgánulos celulares [6] y da lugar a procesos tóxicos.

El estrés oxidativo ha sido descrito como uno de los mecanismos implicados en el daño renal inducido por cadmio [7, 8]. El cadmio parece no generar directamente radicales libres en condiciones fisiológicas, sin embargo, éstos pudieran formarse indirectamente por interacción entre Cd^{2+} y lugares celulares críticos, como es la mitocondria [9]. Diversos estudios confirman que la exposición aguda a cadmio incrementó el estrés oxidativo por producción del anión superóxido y óxido nítrico [10, 11, 12], así mismo, induce peroxidación lipídica y excreción de metabolitos lipídicos en orina [13, 14, 15, 16]. Apoyados en estos estudios, pensamos que un tratamiento preventivo consistente en la administración de un antioxidante, podría prevenir la aparición de patologías asociadas al cadmio entre las que se incluyen: disfunción renal, daños pulmonares, lesiones óseas, disfunciones sexuales, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis.

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos naturales se encuentran en los vegetales y en el vino tinto [17]. La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta

[18]. La quercetina, uno de los flavonoides más abundantes en el reino vegetal, es un potente "scavenger" de radicales libres de oxígeno y un buen quelante de metales [19]. Son numerosos los estudios que confirman la importante capacidad antioxidante de la quercetina y por tanto, su utilidad como posible protector en procesos oxidativos.

Así, el objetivo de nuestro trabajo fue en primer lugar reproducir una intoxicación crónica por cadmio en la que se evidenciara una clara lesión renal, en segundo lugar estudiar el efecto de la quercetina en dicha intoxicación y por último ver la implicación del estrés oxidativo en el posible efecto protector de este antioxidante.

Material y Métodos

Grupos experimentales y reactivos

Este trabajo se realizó con ratas Wistar macho de un peso corporal de aproximadamente 200 gramos, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Para la intoxicación crónica por cadmio se utilizó cloruro de cadmio (CdCl_2) C-2544 lote 49H369 disuelto en solución salina. La quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) Q-0125 lote 21K1690 se preparó disolviendo las cantidades adecuadas en agua Milli Q a la cual se adicionaba Tween 80 en una proporción de 10 μl por cada 100 ml de solución. Ambos productos proceden de Sigma Chemical Co, San Luis, USA. El resto de reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Para todas las determinaciones bioquímicas se utilizó un analizador automático (Roche/Hitachi 917) con Kits comerciales de Randox (Randox Laboratories LTD, United Kingdom), Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y Boehringer Mannheim Biochemica (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany).

En el diseño del estudio se plantearon tres grupos experimentales: Grupo cadmio (Cd) (n:15): ratas a las cuales se les administró cadmio (1,2 mg/kg/día, s.c.) durante nueve semanas (cinco dosis semanales). Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q) (n:15): ratas a las cuales se les administró cadmio (1,2 mg/kg/día, s.c.) durante nueve semanas (cinco dosis semanales) y quercetina (50 mg/kg/día, i.p.) durante cinco semanas (cinco dosis semanales), comenzando la administración a la cuarta semana de iniciado el tratamiento con cadmio. Grupo quercetina (Q) (n:10): ratas a las cuales se les administró quercetina (50 mg/kg/día, i.p.) durante cinco semanas (cinco dosis semanales).

A diferentes tiempos (T0 o basal, T3, a las tres semanas, T6, a las seis semanas y T9, a las nueve semanas), las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales, en las cuales tuvieron libre acceso a la comida y a la bebida. Tras dos días de acostumbramiento a su nuevo entorno, se recogió orina de 24 horas y muestras de sangre del extremo de la cola (unos 150 μl) en capilares heparinizados que se centrifugaron para obtener plasma. Al final del experimento las ratas se anestesiaron y posteriormente fueron perfundidas con solución salina heparinizada a 37 °C; se tomaron muestras de riñón y se almacenaron a -80 °C para su posterior utilización en los estudios de estrés oxidativo.

Estudios de función renal

Para valorar la función renal se llevaron a cabo: aclaramientos de creatinina [20], nitrógeno uréico plasmático (BUN) [21], determinaciones bioquímicas en orina: glucosa [22], proteínas [23] y microalbuminuria [24], determinaciones de actividades enzimáticas marcadoras de lesión renal: N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) [25], fosfatasa alcalina (FA) [26] y gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT) [27].

Estudios de estrés oxidativo

El efecto de la quercetina en el proceso de estrés oxidativo generado por el cadmio se evaluó mediante la determinación de biomarcadores: antioxidantes totales (AT) [28] y dialdehído malónico (MDA) [29] en plasma y superóxido dismutasa (SOD) [30] y glutatión reductasa (GR) [31] en riñón.

Estadística

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos se analizaron mediante su exportación a la aplicación estadística *Number Cruncher Statistical System*, versión 6.0.10 para Windows®. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza de una entrada. A continuación se aplicó del test de *Scheffé* cuando los datos presentaban una distribución normal. Consideramos significativo un valor de *p* menor que 0.005 o 0.001. Los datos se expresan como medias ± error estándar de la media (EEM).

Resultados

Estudio de la nefrotoxicidad producida por cadmio

En este apartado analizamos la evolución de diversos parámetros fisiológicos de las ratas a las que se les administró únicamente cadmio. Estas ratas no aumentaron su peso al ritmo de los animales controles durante el tratamiento. Al finalizar el mismo, el peso corporal era un 19% menor respecto al grupo control (grupo al que se administró quercetina solamente) (tabla 1). El aclaramiento de creatinina disminuyó significativamente después de nueve semanas de tratamiento. También observamos que los valores de nitrógeno uréico plasmático se duplicaron al final del experimento frente a su valor basal. El flujo urinario se vio incrementado, siendo 2.3 veces superior que su valor basal. En la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular se

observó un fuerte incremento al final del estudio (12 veces más). La excreción urinaria de albúmina después de 9 semanas de tratamiento fue 12 veces mayor que su valor basal. Paralelo al incremento de proteínas en orina hubo un aumento de la excreción urinaria de glucosa (glucosuria), siendo éste 3 veces mayor que su valor basal (Tabla 1).

En la figura 1 se refleja la evolución que siguieron las distintas enzimas marcadoras de lesión renal. Los resultados obtenidos en este grupo muestran a las nueve semanas de tratamiento con cadmio un incremento de 10 veces para la NAG (Fig. 1A), de 8 veces para la FA (Fig. 1B) y de 20 veces para la GGT (Fig. 1C), con respecto a sus valores basales.

Efecto de la quercetina sobre la nefrotoxicidad producida por cadmio

En este grupo, Cd-Q, el incremento de peso fue un 25% menor comparado con el grupo Q (Tabla 1). El aclaramiento de creatinina disminuyó significativamente, respecto a su valor basal al final del experimento (1.7 veces), pero en menor proporción que en el grupo Cd (2.0 veces). Los valores de nitrógeno uréico en plasma en este grupo fueron significativamente menores que los del grupo Cd al final del estudio (48.78 mg/dl en el grupo Cd frente a 27.50 mg/dl en el grupo Cd-Q). El valor de flujo urinario en el grupo Cd-Q a las nueve semanas no tuvo diferencias significativas con su valor basal, por otra parte, si comparamos este grupo con el grupo Cd, observamos que hubo un menor incremento de flujo urinario al final del experimento (1.5 veces menos). Respecto a la excreción urinaria de proteínas, en este grupo aumentaron significativamente frente a su valor basal, pero este incremento fue menor que el del grupo Cd (1.7 veces menos). Los niveles de microalbuminuria en el grupo Cd-Q fueron mayores al final del estudio respecto al basal (8.2 veces), pero este incremento fue menor que en el grupo del Cd (1.8 veces). En el grupo Cd-Q, los valores de glucosuria al final del estudio fueron 2.0 veces menores que los del grupo Cd (tabla 1).

En cuanto a la evolución de las enzimas marcadoras de lesión renal en este grupo, observamos que están elevadas respecto a sus valores basales, sin embargo, los incrementos son menores que los descritos en el grupo Cd. Aquí la NAG aumentó 5 veces frente a las 10 veces en el grupo Cd (Fig.1A). La FA aumentó

Tabla 1: Resultados obtenidos de peso corporal, flujo urinario (FU), aclaramiento de creatinina (CL_{creat}), nitrógeno uréico plasmático (BUN), glucosuria, proteinuria y microalbuminuria de los 3 grupos experimentales durante el periodo de estudio. T_0 : tiempo basal, T_9 : tiempo al final del estudio (9 semanas). Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias ± EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo; * vs Cd en el mismo tiempo.

	Cd		Cd-Q		Q	
	T_0	T_9	T_0	T_9	T_0	T_9
Peso (g)	199.75 ± 3.88	395.33 ± 8.67 [#]	209.25 ± 3.09	365.5 ± 11.25 [#]	209.29 ± 3.09	489.00 ± 5.52 ⁺
FU (ml/día/100g peso)	4.55 ± 0.46	10.64 ± 1.85 [#]	3.46 ± 0.34	7.23 ± 1.24	4.69 ± 0.31	3.46 ± 0.40
CL_{creat} (ml/min/100g)	0.43 ± 0.03	0.21 ± 0.03 ⁺	0.39 ± 0.03	0.23 ± 0.01 ⁺	0.41 ± 0.04	0.29 ± 0.01
BUN (mg/dl)	25.31 ± 0.64	48.78 ± 1.53 [#]	25.50 ± 0.73	27.50 ± 1.31 [*]	25.00 ± 1.29	29.25 ± 0.75
Glucosuria (mg/día)	1.46 ± 0.28	4.53 ± 0.62 ⁺	1.16 ± 0.27	2.31 ± 0.57	1.85 ± 0.26	2.32 ± 0.38
Proteinuria (mg/día)	3.85 ± 0.38	48.70 ± 3.65 [#]	4.12 ± 0.85	28.61 ± 3.11 ⁺⁺	5.15 ± 1.03	22.73 ± 0.75
Microalbuminuria (mg/día)	25.84 ± 3.89	311.00 ± 4.56 [#]	21.61 ± 2.25	176.27 ± 6.24 ⁺⁺	22.70 ± 1.46	25.87 ± 2.75

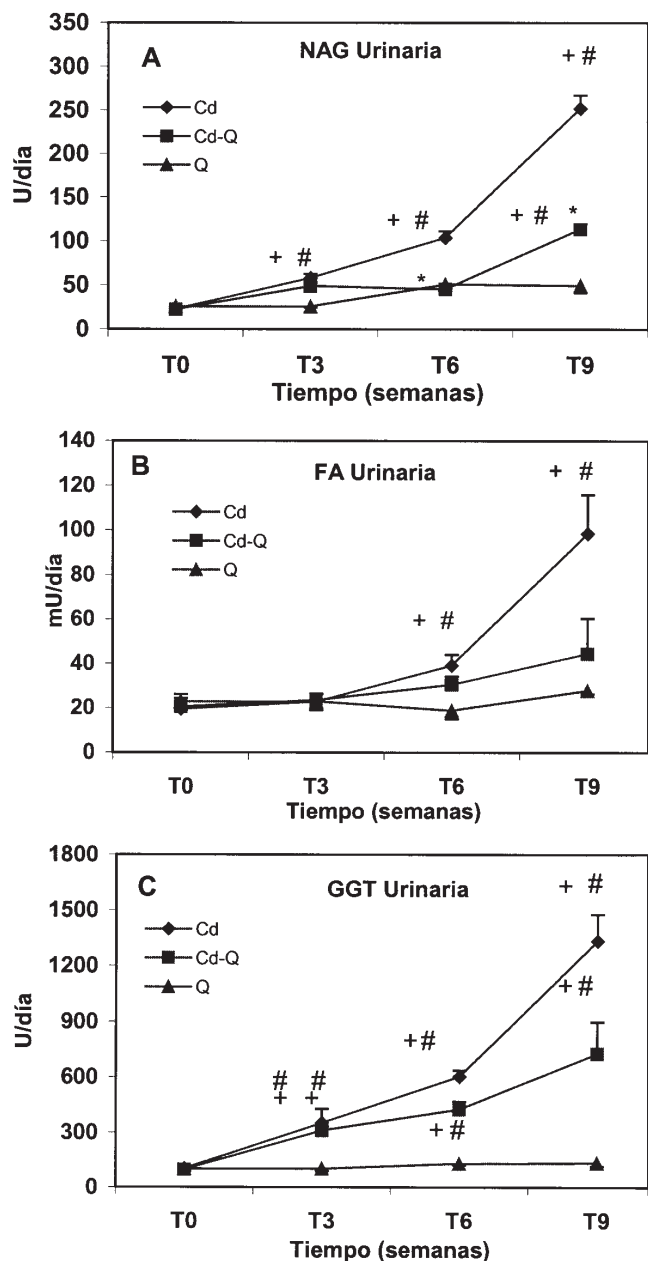


Fig. 1: Evolución de la actividad en orina de la NAG (A), FA (B) y GGT (C) en los 3 grupos durante el periodo de estudio. Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias ± EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo, * vs Cd en el mismo tiempo.

3.5 veces frente a las 8 veces en el grupo del Cd (Fig.1B) y la GGT aumentó 5 veces frente a las 20 veces del grupo del Cd (Fig. 1C).

Estudios de estrés oxidativo

La figura 2A muestra los valores de MDA en plasma. En el grupo Cd, el MDA aumentó a lo largo del estudio alcanzando valores 3.4 veces superiores a los basales. En el grupo Cd-Q los

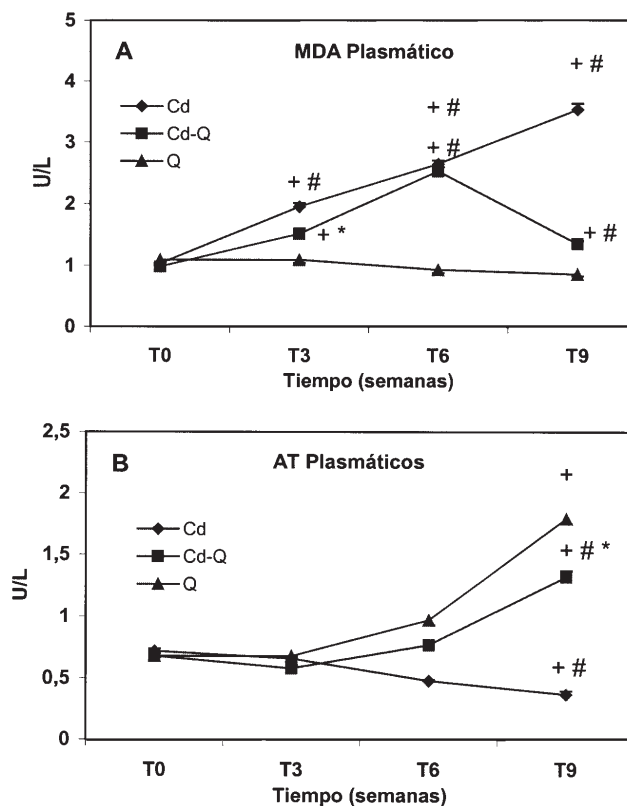


Fig. 2: Evolución de los niveles plasmáticos de MDA (A) y de los AT (B) de los 3 grupos durante el periodo de estudio. Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias ± EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo; * vs Cd en el mismo tiempo.

valores de MDA son similares a los del grupo Cd hasta la sexta semana del estudio (2 semanas de administración de quercetina), pero a partir de este tiempo hay un espectacular descenso de los valores de MDA llegando a ser al final (5 semanas de administración de quercetina) similares a los basales y 2.5 veces inferiores frente al grupo del cadmio solo. En el grupo Q los valores de MDA fueron similares durante todo el estudio.

Cuando cuantificamos los AT en plasma (Fig. 2B) obtuvimos resultados coherentes con los obtenidos en MDA plasmático (Fig.2A). En el grupo Cd los AT fueron disminuyendo durante todo el estudio, siendo esta disminución significativa a partir de la sexta semana de haber iniciado el tratamiento. Al final de éste, los resultados fueron la mitad de los basales. En el grupo Q ocurrió todo lo contrario, los valores de AT fueron aumentando durante el tratamiento con quercetina siendo 3 y 5 veces superiores frente a los basales y al grupo Cd, respectivamente. En el grupo Cd-Q los valores de AT al principio del estudio (4 semanas) siguieron la misma evolución que los del grupo Cd, hasta que se le administró la quercetina, a partir de ese momento los AT fueron aumentando hasta el final del estudio, siendo 2 y 3.5 veces superiores frente a su valor basal y al grupo Cd, respectivamente.

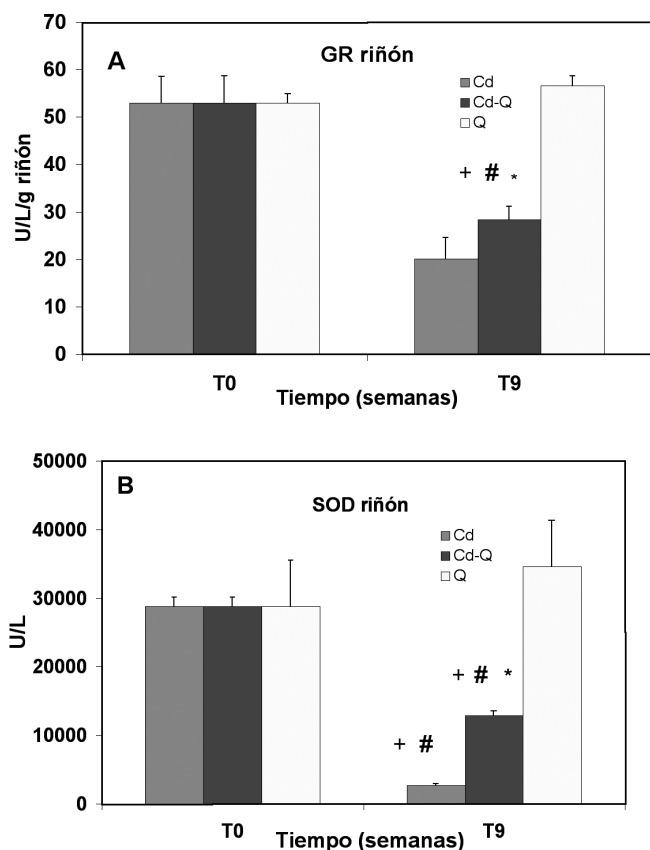


Fig. 3: Valores de GR (A) y de SOD en riñón (B). Basales (T0) y al final del estudio (T9) en los 3 grupos durante el periodo de estudio. Grupo cadmio (Cd), Grupo cadmio y quercetina (Cd-Q), Grupo quercetina (Q). Los datos se expresan como medias ± EEM. Diferencias estadísticas significativas, $p < 0.05$, según el test de Scheffé: # vs Q en el mismo tiempo; + vs basal del mismo grupo; * vs Cd en el mismo tiempo.

La GR (Fig.3A) y la SOD (Fig.3B) en riñón, en el grupo de Cd, disminuyeron 2.5 y 10 veces respectivamente frente al grupo control (grupo de quercetina sola). En el grupo Cd-Q estas enzimas también disminuyeron respecto al grupo control, pero esta disminución fue significativamente menor frente al grupo Cd.

Discusión

El riñón es el órgano principalmente afectado en la toxicidad producida por cadmio [32, 33]. Esta nefrotoxicidad se piensa que es causada por el complejo CdMT, el cual procede del hígado y se acumula en el riñón produciendo necrosis en las células del túbulo proximal [2, 4, 34, 35].

El modelo elegido para nuestro estudio, administración de cadmio durante nueve semanas, indujo un claro deterioro de la función renal. El tratamiento con cadmio, a la novena semana duplicó los valores del flujo urinario y del nitrógeno uréico en plasma, y disminuyó a la mitad los del aclaramiento de creatinina endógena respecto a los niveles basales. Estas alteraciones pueden deberse al efecto tóxico que produce el cadmio sobre los

segmentos S₁ y S₂ de los túbulos renales, afectando a las células del túbulo proximal, donde se reabsorbe este metal [35]; así, el incremento en el flujo urinario se justificaría por la alteración en los procesos de reabsorción. Por su parte la glucosa, es reabsorbida en esta porción del túbulo proximal, con lo que un daño a este nivel, explicaría el exceso de glucosa en orina que aparece al final del estudio.

Tanto la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular, como de albúmina sufrieron un aumento significativo al final del tratamiento con cadmio (12 veces más). Nuestros resultados, son similares a los encontrados por Elinder y cols. [36] y por Roels y cols. [37, 38] en los que observan como primer signo de daño renal un incremento de las proteínas séricas de bajo peso molecular en la orina. Este hecho es debido a una alteración en la reabsorción tubular, como consecuencia del daño producido por el cadmio sobre las células del túbulo proximal. Posteriormente observan que hay un aumento en la eliminación de proteínas de alto peso molecular (albúmina) como consecuencia de una mayor permeabilidad del glomérulo, resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio. Esto indica que además de haber daño tubular también existe daño glomerular. Estos hechos han sido contrastados también en estudios epidemiológicos [39], observando que trabajadores con excesiva exposición a cadmio tenían en orina proteínas de bajo peso molecular, tales como RBP, lisozima, ribonucleasa, además de proteínas de alto peso molecular, como albúmina y transferrina, indicando esto que tenían una proteinuria mixta.

Cuando analizamos los marcadores de lesión renal en el grupo al que se administró cadmio, observamos que las actividades de las enzimas se van incrementando ligeramente a partir de la tercera semana, pero este incremento es más pronunciado desde la sexta semana hasta el final del tratamiento. La NAG es una enzima lisosomal, utilizada como biomarcador de nefrotoxicidad [40, 41], y su aumento en orina refleja daño tubular renal [41]. La excreción urinaria inicial de NAG, tras la administración de cadmio, parece estar relacionada con un aumento en la exocitosis lisosomal, mientras que aumentos posteriores pueden deberse a necrosis de las células del túbulo proximal [42]. La FA es una enzima asociada al borde en cepillo, y su mayor excreción urinaria indica necrosis de las células tubulares renales [43]. La GGT es una enzima determinante de la desestructuración del cepillo del epitelio tubular y es útil para determinar necrosis tubular [44, 45]. Todos los valores de las enzimas en orina nos indican que ha habido necrosis de las células tubulares y, por consiguiente daño renal. En los estudios de Liu y Zahir [46, 47] también se describe un incremento en la actividad de estas enzimas en orina a las cinco o seis semanas después de iniciar su estudio con cadmio.

El mecanismo por el cual se produce el daño tóxico parece estar relacionado con el estrés oxidativo. Diversos estudios han observado como el cadmio disminuye los niveles tisulares de GSH, potente antioxidante endógeno [48], induce peroxidación lipídica y excreción de metabolitos lipídicos en orina [13, 14, 15] y además, produce daño en todo el riñón, incluyendo necrosis tubular proximal, degeneración de las células tubulares, proliferación e inflamación glomerular, fibrosis cortical y nefritis

intersticial y apoptosis [46]. Estos resultados explicarían el incremento en los marcadores de lesión renal, NAG, FA y GGT.

En nuestro estudio cuantificamos MDA, como producto de peroxidación lipídica, observando que estaba muy elevado en plasma, lo que nos indica que hubo un aumento en la formación de radicales libres de oxígeno. Además, los AT plasmáticos estaban disminuidos a la mitad en este grupo. La disminución de antioxidantes endógenos (ac. Ascórbico, proteínas con tioles, Bilirrubina, ac. Úrico, α -Tocoferol, Ceruloplasmina, Transferrina, Cisteína, GSH, Carotenos, ac. Lipóico, Ubiquinona) pudiera deberse al gasto de los mismos para contrarrestar los radicales libres de oxígeno. La SOD y la GR son dos enzimas endógenas que catalizan la eliminación de radicales libres. Nuestros resultados muestran que en el grupo Cd, estas enzimas estaban muy disminuidas; esto es debido, posiblemente, a que el tratamiento crónico con cadmio aumenta el estrés oxidativo, haciendo que haya un desgaste en la actividad enzimática de las mismas.

El segundo objetivo fue estudiar el efecto de la quercetina en la intoxicación crónica por cadmio. La quercetina es uno de los flavonoides más abundante de la dieta humana, que se ha descrito como un potente "scavenger" de radicales libres de oxígeno y un buen quelante de metales [19]. Además, la quercetina, tiene un efecto citoprotector mediado por la disminución de NO [49, 50], preserva del daño tubular y de la inflamación intersticial [51], también parece prevenir la peroxidación lipídica en la obstrucción biliar y disminuye la deposición de colágeno y la fibrogénesis [52]. La dosis administrada de quercetina fue de 50 mg/kg/día, ya que ha sido la más utilizada en estudios de este flavonoide anteriores a los nuestros [53]. La vía de administración elegida fue la intraperitoneal ya que la absorción por vía oral no es completa [53, 54]. Se empezó a administrar a la cuarta semana de haber iniciado el tratamiento con cadmio, debido a que el daño renal aparece a la quinta o sexta semana de su administración.

Los resultados obtenidos en el grupo al que se administró cadmio y quercetina indican que, después de iniciado un proceso tóxico con cadmio, la administración de quercetina redujo claramente el daño renal producido por este elemento. Se observó un menor incremento en marcadores de función renal como el flujo urinario y el nitrógeno uréico en plasma, respecto al grupo Cd. En el caso de las enzimas marcadoras de lesión renal (NAG, GGT, FA) también se obtuvieron valores inferiores en el grupo Cd-Q frente a los del grupo Cd, igual que la glucosuria, la proteinuria y la microalbuminuria.

Los mecanismos por los cuales la quercetina reduce la nefrotoxicidad producida por el cadmio no están muy claros, ya que son diversas sus propiedades biológicas. Uno de estos mecanismos podría estar relacionado con sus propiedades antiinflamatorias y relajantes vasculares, a través del metabolismo del ácido araquidónico. Los productos finales de la cascada del ácido araquidónico pueden ser considerados como agentes homeostáticos implicados en el mantenimiento de la integridad de los procesos inflamatorios del sistema cardiovascular y del sistema renal. Un desequilibrio en la síntesis de prostaglandinas puede provocar alteraciones cardiovasculares y renales. Los flavonoides han mostrado que son inhibidores de la síntesis de eicosanoides por

inhibir las actividades de la lipooxigenasa [55] y de la ciclooxigenasa [56]. Este efecto supondría la inhibición de mediadores vasoconstrictores (prostaglandinas vasoconstrictoras, tromboxanos,...) implicados en el daño renal producido por vasoconstricción. Estos mecanismos, además están estrechamente relacionados con la actividad más importante de la quercetina que es la antioxidante e inhibidora de la peroxidación lipídica [57, 58, 59, 60].

Nuestro estudio pone de manifiesto que la quercetina es un potente antioxidante, capaz de revertir el incremento de peroxidación lipídica producido por cadmio a sus valores basales, además de aumentar altamente los antioxidantes plasmáticos endógenos, protegiendo a las células de este proceso dañino que cursa con necrosis y apoptosis celular. Además, la quercetina protege del daño renal, ya que hay una disminución en la orina de los marcadores de daño renal (NAG, GGT, FA), y una mejora de la función renal.

Son diversos los estudios que han empleado antioxidantes para proteger del daño renal inducido por cadmio. La co-administración de cadmio y N-acetil-cisteína (NAC), disminuyó la actividad de enzimas marcadoras de daño hepático, como la alanina-amino-transferasa y de lesión renal, como la lactato deshidrogenasa. Esta protección parece ser debida a una inhibición de la peroxidación lipídica que se midió como disminución de MDA [47]. Por otra parte, la NAC es donadora del aminoácido cisteína y facilita la síntesis de GSH, siendo el GSH, como hemos apuntado antes, antioxidante y posible acomplejante del cadmio [61].

Otro antioxidante, la vitamina E, también fue empleado para ver su efecto sobre el estrés oxidativo generado por cadmio, resultando ser efectiva para prevenir la toxicidad hepática y renal, posiblemente por una disminución de la peroxidación lipídica [47], además la vitamina E ha demostrado actuar como un "scavenger" de radicales libres [62, 63, 64]. Otro de los mecanismos posibles para esta acción protectora está relacionado con su capacidad para estabilizar y proteger a la membrana celular, debido a la interacción entre el α -tocoferol con los ácidos grasos insaturados de fosfolípidos [65, 66]. En este sentido, la vitamina E podría proteger las alteraciones producidas por el complejo Cd-MT en los lípidos de la membrana de las células del borde en cepillo [67].

Los efectos de la administración de Selenio apoyan también el papel del estrés oxidativo en la toxicidad inducida por cadmio. Este metal, esencial para el mecanismo detoxificante de la formación del radical superóxido, ha demostrado tener un efecto protector en este tipo de intoxicación [68].

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la administración subcutánea de CdCl₂ a la dosis de 1.2 mg/kg/día durante nueve semanas es un buen modelo experimental para reproducir una intoxicación crónica por cadmio. También observamos que el flavonoide quercetina a la dosis de 50 mg/kg/día durante cinco semanas ejerce un efecto protector sobre las lesiones y funcionalidad renal que aparecen en nuestro modelo experimental. Por último, la acción antioxidante de la quercetina parece ser la responsable del efecto protector ejercido por la misma, confirmando que el estrés oxidativo juega un importan-

te papel como mecanismo tóxico en la generación del daño renal producido por cadmio.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) con cargos al proyecto VIN02-019.

Bibliografía

- Elinder CG (1992) Cadmium as an environmental hazard. *IARC Sci Publ* 118: 123-132.
- Foulkes C (1978) Apparent competition between myoglobin and metallothionein for renal reabsorption. *Proc Soc Exp Biol Med* 159(3): 321-323.
- Cain K, Holt DE (1983) Studies of cadmium-thionein induced nephropathy: time course of cadmium-thionein uptake and degradation. *Chem Biol Interact* 43(2): 223-237.
- Klaassen CD, Choudhuri S, McKim JM, Jr, Lehman-McKeeman LD, Kershaw WC (1994) In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environ Health Perspect* 102(3): 141-146.
- Cherian MG, Goyer RA, Delaquerriere-Richardson L (1976) Cadmium metallothionein induced nephropathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 38: 399-408.
- Chavez E, Briones R, Michel B, Bravoc B, Jay D (1985) Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: Studies with cadmium. *Arch Biochem Biophys* 242: 493-497.
- Shaikh ZA, Vu T, Zaman K (1999) Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium hepatotoxicity and nephrotoxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 256-263.
- Brennan RJ (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat Res* 356(2):171-178.
- Ochi T (1987) Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutat Res* 180(2): 257-266.
- Hassoun EA, Stohs SJ (1996) Cadmium induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Rev Toxicol* 112: 219-226.
- Koizumi T, Li Z (1992) Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health* 37 (1): 25-36.
- Koizumi T, Shirakura G, Kumagai H, Tatsumoto H, Suzuki KT (1996) Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. *Rev Toxicol* 14 (2): 125-134.
- Manca D (1991) Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Rev Toxicol* 67 (3): 303-323.
- Sarkar S, Yadav P, Trivedi R, Bansal AK, Bhatnagar D (1995) Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol* 9 (3): 144-149.
- Bagchi D (1996) Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol Trace Elem Res* 52 (2): 143-154.
- Senturk UK (1994) Cadmium induced lipid peroxidation in kidney function. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 5 (3-4): 305-313.
- Goldberg DM, Hanh SE, Parkes JG (1995) Beyond alcohol : beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta* 237: 155-187.
- Benthath A, Rusznyák S, Szent-György A (1936) Vitamin nature of flavone. *Nature*; 798. *Flavonoids in Health and Disease*. Ed. Marcel Dekker, INC. New York. 5: 137-161.
- Jovanovic SV, Simic MG (2000) Antioxidant in nutrition. *Ann N Y Acad Sci*. 899: 326-34.
- Bonsnes RW, Tausski HA (1945) The colorimetric determination of creatinine of the Jaffe reaction. *J Biol Chem* 158: 581-584.
- Talke H, Schubert GE (1965) Enzymatische Harnstoffbestimmung im Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin Wschr* 43: 174-175.
- Trinder P (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6:24-27.
- 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.
- Multicenter study of Tina-quant Albumin in urine and β -NAG in urine. Workshop Munich (1991), *Wien klin Wschr* 103, supplement 189:1-64.
- Yakata M, Sugita O, Sakai T, Uchiyama K, Wada K (1983) Urinary enzyme determination and its clinical significance. Enzyme derived from the kidney tubular epithelium—N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. Preclinical evaluation of the urinary NAG activity and changes in renal diseases. *Jap. J Clin Path Suppl* 56:90-101.
- Rosalki SB, Foo AY, Burlina A (1993) Multicenter evaluation of iso-ALP test kit for measurement of bone Alkaline Phosphatase activity in serum and plasma. *Clin Chem* 39:648-652.
- Persijn JP, van der Slik W (1976) A new method for the determination of g-Glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 14:421-427.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. Apr;84(4):407-412.
- Recknagel RO, Glende EA Jr (1984) Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods Enzymol* 105:331-337.
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10): 3170-3175.
- Goldberg DM, Spooner RJ (1983) Determination of glutathione reductase activity. *Methods of Enzymatic Analysis* Ed. Bergmeyer HV 3^o ed. Vol. 3: 258-265.
- Friberg L (1984) Cadmium and the kidney. *Environ Health Perspect* 54: 1-11.
- Goyer RA, Cherian MG (1995) Renal effects of metals. *Metal Toxicology*. Academic Press. San Diego. 389-412.
- Nordberg GF, Kjellström T, Nordberg M (1985) Kinetic, dose and metabolism. Cadmium and Health. Vol I. Exposure, dose and metabolism. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Goldstein SR, Schnellmann RG (1996) Toxic responses of the kidney. En: Klaassen CD, Amdur MO, Doull J Casarett and Doull's. *Toxicology: The basic science of poisons*. Ed. Mc Graw Hill. - 5th ed. Kansas. 417-443.
- Elinder CG, Edling C, Lindberg E, Kägedal B, Vesterberg O (1985) b2-microglobulinuria among workers previously exposed to cadmium: follow-up and dose-response analyses. *Am J Ind Med* 8: 553-564.

37. Roels HA, Lauwerys RR, Buchet JP, Bernard AM, Vos A, Oversteyns M (1989) Health significance of cadmium induced renal dysfunction: a five year follow up. *Br J Ind Med* 46: 755-764.
38. Roels HA, Lauwerys RR, Buchet JP, Bernard AM, Lijnen P, Van Houte G (1990) Urinary kallikrein activity in workers exposed to cadmium, lead, or mercury vapour. *Br J Ind Med* 47: 331-337.
39. Lauwerys R, Roels H, Regniers M, Buchet JP, Bernard A, Goret (1979) A significance of cadmium concentration in blood and urine in workers exposed to cadmium. *Environ Res* 20: 375-391.
40. Patel V, Luft EC, Yum MN, Patel B, Zeman W, Klert SA (1975) Enzymuria in gentamicin-induced kidney damage. *Antimicrob Agents Chemother* 7: 364-369.
41. Gibey R, Dupond JL, Alber D, Leconte des Floris R, Henry JC (1981) Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), alanine-aminopeptidase (AAP) and beta-2-microglobulin (beta 2M) in evaluating nephrotoxicity of gentamicin. *Clin Chim Acta* 116 (1): 25-34.
42. Josepovitz C, Farrugella T, Levine R, Lane B, Kaloyanides GJ (1985) Effect of netilmicin on the phospholipid composition of subcellular fractions of the rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 810-819.
43. Josepovitz C, Pastoriza- Muñoz E, Timmerman D, Scott M, Feldman S, Kaloyanides GJ (1982) Inhibition of gentamicin uptake in rats renal cortex *in vivo* by aminoglycosides and organic polications. *J Pharmacol Exp Ther* 223: 314-321.
44. Porter GA (1994) Urinary biomarkers and nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab* 20: 181-186.
45. Price RG (1982) Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Rev Toxicol* 23: 99-134.
46. Liu J, Liu YP, Habeebu S, Klaassen CD (1998) Susceptibility of MT-null mice to chronic Cd-Cl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci* 46(1): 197-203.
47. Zahir A. Shaikh, Thanhtram T Vu, Khalequz Zaman (1999) Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 256-263.
48. Meister A, Anderson ME (1983) Gluthatione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
49. Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, Patton S, Malinski T (1998) Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg* 85 (8): 1080-1085.
50. Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R (1999) Influence of the antioxidant quercetin *in vivo* on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 57 (2): 199-208.
51. Shoskes DA (1998) Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation* 66 (2): 147-152.
52. William P, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Maroni N, Gonzalez-Gallego J (2000) The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 33: 742-750.
53. Terao J (1999) Dietary flavonoids as antioxidants *in vivo*: Conjugated metabolites of epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma. *J Med Invest* 46 (3-4): 159-168.
54. Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related flavonoids. *Food Chem Toxicol* 33 (12): 1061-1080.
55. Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Kohno S (1983) Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 116 (2): 612-618.
56. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult RS (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharmacy Pharmacol* 40: 787-792.
57. Das M, Ray PK (1988) Lipid antioxidant properties of quercetin *in vitro*. *Biochem Int* 17 (2): 203-209.
58. Sahu SC, Washington MC (1991) Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer Letters* 58: 75-79.
59. Sahu SC, Washington MC (1991) Effect of antioxidants on quercetin-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Letters* 60: 259-264.
60. Sahu SC, Washington MC (1992) Effect of ascorbic acid and curcumen on quercetin-induced nuclear DNA damage, lipid peroxidation and protein degradation. *Cancer Letters* 63: 237-241.
61. Rana SV, Verma S (1996) Protective effects of GSH, vitamin E, and selenium on lipid peroxidation in cadmium-fed rats. *Biol Trace Elem Res* 51: 161-168.
62. Burton GW, Ingold KU (1981) Autoxidation of biological molecules. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidant *in vitro*. *J Am Chem Soc* 103: 6472-6477.
63. Liebler DC (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J Biol Chem* 261 (26): 12114-12119.
64. Pawluczuk DS, Wong YM (1989) a-Tocopherol as a potential modifier of the toxicity of anthracycline antibiotics. *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine* (J. Miquel Eds.) CRC press, Cleveland. 269-280.
65. Diplock AT (1971) The effect of vitamin E on the oxidation state of selenium in rat liver. *Biochem J* 123 (5): 721-729.
66. Erin AN (1984) Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids. A hypothetical mechanism of stabilization of biomembranes by vitamin E. *Biochem Biophys Acta* 774 (1): 96-102.
67. Selenke W (1981) The binding of cadmium metallothionein to isolated renal brush border membranes. *Proc Soc Exp Biol Med* 167 (1): 40-44.
68. Stajn A (1997) Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 117 (2): 167-172.