

Trabajo Original

Toxicología Experimental

La administración de *Chlorella vulgaris* protege contra la nefrotoxicidad ocasionada por el CCl₄.

Valadez-Omaña María Teresa, Gutiérrez-Flores Octavio, Jiménez-Sánchez Nayelly, Romero-Valdéz Mayumi, Massé-Sánchez Alan, Tadeo-Jiménez Yvonne, Morales-Ramos Edgar, Baltazar-Salvador Santos, Gallardo-Casas Carlos Angel*

Academia de Biología. Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos No. 6 "Miguel Othón de Mendizábal", I.P.N., Av. Jardín y calle 4, Col del Gas. Del. Azcapotzalco, México, D. F. C. P. 02050

*Correspondencia: M en C. Carlos Angel Gallardo-Casas

Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos "Miguel Othón de Mendizábal", I.P.N
Av. Jardín y calle 4, Col del Gas. Del. Azcapotzalco, México, D. F. C. P. 02050

Teléfono: (525) 729-6000/66033

carlosgallardo84@hotmail.com

Resumen

La microalga *Chlorella vulgaris*, es utilizada como alimento en la acuicultura debido a su alto contenido de nutrientes, investigaciones recientes han encontrado que otras microalgas del género tienen propiedades antioxidantes y citoprotectoras. El objetivo de esta investigación fue estudiar si el daño celular en el riñón inducido por la administración de CCl₄, es prevenido por la administración de esta microalga. Se utilizaron 32 ratones machos de la cepa NIH que se dividieron aleatoriamente en 4 grupos: a) Control, que recibió solución salina (s.s) i.g + Aceite de maíz (i.p), b) Intoxicado con CCl₄ (2.5 mL/Kg) i.p + s.s i.g, c) *Chlorella vulgaris* (1000 mg/Kg) i.g + Aceite de maíz (i.p), d) *Chlorella vulgaris* (1000 mg/Kg) i.g + CCl₄ i.p. Se extrajeron los riñones y se realizó la técnica convencional de inclusión en parafina y la tinción H-E, también se midió la lipoperoxidación, y actividad de catalasa y γ -Glutamyl transferasa en riñón y la actividad de la LDH (Lactato deshidrogenasa) en suero. El CCl₄ produjo glomeruloesclerosis, atrofia, pérdida de la continuidad celular y cambios en la relación núcleo citoplasma en la médula y corteza renal, provocando mortandad en este grupo, mientras que *Chlorella vulgaris* redujo la mortalidad y las alteraciones morfológicas del riñón, así como la peroxidación, el aumento de la actividad de la LDH y promovió un aumento de la γ -Glutamyl transferasa, por lo cual se concluye que es un buen citoprotector frente a la neurotoxicidad producida por el CCl₄.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, nefrotoxicidad, protección renal

Abstract

The administration of *Chlorella vulgaris* protects against nephrotoxicity caused by CCl₄.

Chlorella vulgaris microalgae, is used as nourishment in aquaculture because of its high nutritional content. Recent researches had found anti-oxidative and cito-protective qualities in microalgae of this genus. The aim of this research was to study if cell damage in the kidney induced by intoxication with CCl₄ which damages renal tissue, is prevented with the administration of this microalgae. For this, we used 32 male NIH mice, that were divided in 4 groups: a) Control, which received salt solution i.g + Corn-oil (i.p), b) Intoxicated with CCl₄ (2.5 mL/Kg) i.p + s.s i.g, c) *Chlorella vulgaris* (1000 mg/Kg) i.g+ Corn-oil (i.p) and d) *Chlorella vulgaris* (1000 mg/Kg) i.g + CCl₄ i.p. The kidneys were extracted, embeded in paraffin and stained by conventional method H-E. The lipoperoxidation, Catalase, γ -Glutamyl transferase were also measured in kidney, and LDH activity in serum. The CCl₄ produced glomeruloesclerosis, atrophy, loss of cell continuity and changes in the nuclei - cytoplasm relation in marrow and renal cortex, while *Chlorella vulgaris* reduced the mortality and kidney morphological damage and the per-oxidation, the increase of the LDH activity and also an increase of the γ -Glutamyl transferase is promoted. With these results we conclude that this microalgae is a good citoprotector against CCl₄ which causes renal damage.

Key words: *Chlorella vulgaris*, nephrotoxicity, renal protection

Introducción

El CCl_4 es un potente nefrotóxico que produce radicales libres que dañan al ADN, proteínas y principalmente produce lipoperoxidación¹⁸. El CCl_4 daña los túbulos renales alterando las microvellosidades del epitelio, pero también la ultraestructura mitocondrial, lo que resulta de un desacople de la cadena respiratoria favoreciendo la formación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno¹⁶. También se afecta el sistema enzimático antioxidante que constituye la primera línea de defensa contra radicales libres y/o especies reactivas¹⁷, dicho sistema no puede compensar el aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno llevando al tejido renal a un estado de estrés oxidante.

Actualmente debido a sus mecanismos de acción, este tóxico es utilizado para evaluar diferentes sustancias nefroprotectoras¹⁰.

Por otra parte *Chlorella vulgaris* es una microalga ampliamente distribuida y con muchos usos en la acuicultura: para producir biodiesel, como suplemento alimenticio y para prevenir el estrés oxidativo ya que es rica en micronutrientes, vitaminas, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, así como luteínas y clorofila¹⁴.

Se ha demostrado también el gran potencial de *Chlorella* como antiviral, antibacteriano, efectos inmunogénicos¹² y citoprotector contra toxinas que causan estrés oxidativo y daño celular¹¹.

Material y métodos

Obtención de la biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Se partió de la cepa de *Chlorella vulgaris* proporcionada por el Departamento de Botánica de la ENCB-IPN y fue identificada por la bióloga Catalina Mendoza González de la misma institución.

Los cultivos se escalaron hasta tener lotes continuos de 20 L mantenidos en medio mineral a temperatura de 24 ± 2 °C, con flujo de aire continuo proporcionado por bombas de aire MAXIMA (Hagen) para 113.6 L, iluminación constante ($180 \mu\text{E} / \text{m}^2\text{s}$) de lámparas de halógeno (luz blanca) durante las 24 horas. Se recuperó la biomasa por filtrado y se colocó en estufa durante 24 horas a 60°C para evaporar el agua.

Tratamiento de los animales

Se emplearon 32 ratones macho de la cepa NIH con un peso promedio de 25 s 30 gramos, los cuales se separaron aleatoriamente en 4 grupos: a) Control, que recibió solución salina (s.s) intragástrica (i.g) + Aceite de maíz intraperitoneal (i.p), b) Intoxicado con CCl_4 (2.5 ml/Kg) vía i.p + s.s i.g, c) *Chlorella vulgaris* (1000 mg/Kg) i.g+ Aceite de maíz (i.p), d) *Chlorella vulgaris* (1000 mg/Kg) i.g + CCl_4 i.p. La administración de *Chlorella vulgaris* o solución salina se realizó 30 minutos antes y dos horas después de la administración del CCl_4 o aceite de maíz.

Los ratones se mantuvieron en cajas de acrílico de 40x40 con acceso libre de agua y alimento, se tomó el peso corporal de los animales y después de 16 horas, se sacrificaron por dislocación cervical. Inmediatamente después de haber realizado el sacrificio, se obtuvieron los riñones y el suero de cada animal.

El riñón derecho se empleó para cuantificar la peroxidación de lípidos, la actividad de catalasa y de la γ -Glutamyl transferasa. El riñón izquierdo se empleó para realizar el análisis histológico por la técnica topográfica de hematoxilina-eosina.

El suero se utilizó para determinar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la ley mexicana para la producción, cuidado y tratamiento de animales de laboratorio NOM-082-ZOO-1999.

Estudio histológico

Los órganos fueron fijados durante 72 horas en formol, para posteriormente incluirlos en parafina. Se obtuvieron 4 cortes coronales de 7 µm de cada riñón y posteriormente fueron teñidos por la técnica de hematoxilina-eosina. El estudio microscópico se realizó a doble ciego, analizándose 20 secciones de tejido para cada uno de los órganos evaluados⁶.

Determinación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La enzima se determinó en suero, según las especificaciones del Kit LDH Liqui-UV de Stanbio. Los resultados se expresan en Unidades Internacionales / Litro.

Contenido de TBARS (Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico)

Se empleó una muestra de 0,1g de tejido, homogenizado en 5 mL de regulador Tris-HCl 0,15 M pH 7,4 y se mezclaron con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, 2 ml de TBA (0,67%) y se calentaron durante 1 hora a 100 °C. Posteriormente se colocaron en baño de hielo y después del enfriamiento, el precipitado se eliminó por centrifugación durante 15 minutos a 6000 rpm. La absorbancia de la muestra se midió a 535 nm utilizando un blanco que contiene todos los reactivos excepto el tejido homogeneizado. Como el 99% de los TBARS es malondialdehído (MDA), las concentraciones de TBARS de las muestras se calcularon utilizando una curva de concentraciones crecientes de MDA⁷

Actividad de la Catalasa

La actividad de la catalasa fue medida por medio de la técnica de Aebi de 1984¹, la cual se basa en la desaparición del H₂O₂ a 240 nm. La mitad del riñón derecho fue homogenizada en 3 mL de regulador de fosfatos 10Mm pH 7.4. Se colocaron 10 µl de

del homogenizado en 3 mL de regulador de fosfatos 100 mM, pH 7,4 que contenía H₂O₂ 30 mM. Se midió la absorbancia a los 0, 15 y 30 segundos. Para expresar estos resultados se midieron las proteínas del homogeneizado por el método de Bradford⁵. Los datos se presentan como k/mg de proteínas¹.

Determinación de la enzima γ -Glutamyl transferasa

La enzima se determinó en tejido, según las especificaciones del Kit γ -GT de SPINREACT. Los resultados se expresan en Unidades Internacionales / Litro.

Análisis estadístico

Las gráficas muestran la media \pm el error estándar. Se analizaron usando un análisis de varianza de una vía y la prueba de Student Newman-Keuls. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados y Discusión

En cuanto a la mortalidad, se observa que el grupo control y el que recibió sólo la dosis de 1000 mg/kg de *Chlorella vulgaris* presentaron 100% de sobrevivencia, mientras que el grupo tratado con CCl₄ presentó una tasa de mortalidad del 40%. La mortalidad fue parcialmente reducida en el grupo tratado con 1000 mg/kg de *Chlorella vulgaris*, ya que presentó un 80% de supervivencia. Estos resultados coinciden con los de Blas-Valdivia y col.⁴, donde encuentran que *Chlorella vulgaris* disminuye la mortalidad debida al Hg (II) evitando el estrés oxidativo por este metal en el riñón.

En la Figura 1, se observa la zona cortical de los individuos controles, donde se observan los glomérulos. Entre los distintos glomérulos pueden observarse las secciones longitudinales y transversales de los túbulos contorneados proximales y distales. En la médula renal observamos grandes túbulos colectores acompañados de otras estructuras ductales más pequeñas correspondientes a las asas de Henle. Esta citoarquitectura se

observa tanto en animales controles como en el grupo al que sólo se administró *Chlorella vulgaris*.

En los animales tratados con CCl_4 presentan marcada atrofia glomerular y atrofia de los túbulos contorneados con distorsión de la continuidad celular y ausencia de núcleos, congestión de vasos en glomérulos y discontinuidad celular en la zona medular. En los animales que recibieron el tratamiento con *Chlorella vulgaris* e intoxicados con CCl_4 , se revierte el daño en la zona cortical, mientras que en la medular se encontró solo una ligera atrofia celular sin llegar a la discontinuidad.

La Figura 2 muestra la pérdida de peso en los grupos tratados con CCl_4 , esta pérdida no es prevenida por la administración de *Chlorella vulgaris*, coincidiendo con la atrofia observada en la zona medular renal.

En la figura 3 se muestra que los animales tratados con CCl_4 presentaron un incremento en la actividad de la LDH, probablemente relacionada a la destrucción del parénquima renal y hepático², lo que aumenta significativamente su actividad en suero. La dosis 1000 mg/kg de *C. vulgaris* protegió contra los cambios causados por el CCl_4 y evitó la pérdida de células del riñón evitando el incremento de este biomarcador.

Con respecto al daño oxidativo, se encontró que los animales tratados con CCl_4 presentaron estrés oxidativo, *C. vulgaris* protegió contra la peroxidación de lípidos (Figura 4), posiblemente sus componentes fitoquímicos neutralizan radicales⁷.

La figura número 5 muestra la actividad de la catalasa, el CCl_4 reduce significativamente la actividad de la enzima, lo cual contribuye al daño celular, ya que no puede compensar el incremento de peróxido de hidrógeno intracelular¹⁷. La administración de *C. vulgaris* no previene la disminución de su actividad y no participa de la citoprotección. En la figura 6 observamos que la actividad de la enzima γ -Glutamil transferasa no es afectada por el CCl_4 a esta dosis y tiempo, sin embargo aumenta su actividad cuando se administra con *C. vulgaris*, posiblemente debido a que sus componentes fitoquímicos incrementan la actividad enzimática⁸, compensando la disminución del glutatión¹⁷ participando directamente en la citoprotección.

Conclusiones

Chlorella vulgaris evidenció un efecto citoprotector contra el daño renal ocasionado por CCl_4 , y se propone que esta microalga podría ser utilizada sola o añadida a suplementos alimenticios cuando se padezca una enfermedad donde participe el estrés oxidante renal. Considerándose que se deben hacerse estudios preclínicos en otras especies animales y ensayos clínicos controlados para evaluación farmacológica y toxicológica.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el proyecto 20100475 SIP-IPN. V-O MT es becaria al Estímulo al desempeño docente (EDD) y T-J Y, G-F O, B-S S son becarios del proyecto institucional de formación de investigadores (PIFI IPN).

Figura 1. Fotomicrografías del tejido renal. MÉDULA. A Grupo control. B' *C. vulgaris* C Dañado con CCl₄. D' *C. vulgaris* + CCl₄. CORTEZA. A' Grupo control. B' Control-Alga. C' Dañado con CCl₄. D' Reto con Alga. El tratamiento con CCl₄ ocasionó atrofia y vasocongestión en la zona cortical. (Flechas en C'). En la zona medular se presenta discontinuidad celular (Flechas en C). La administración de *Chlorella vulgaris* previno contra dichas alteraciones

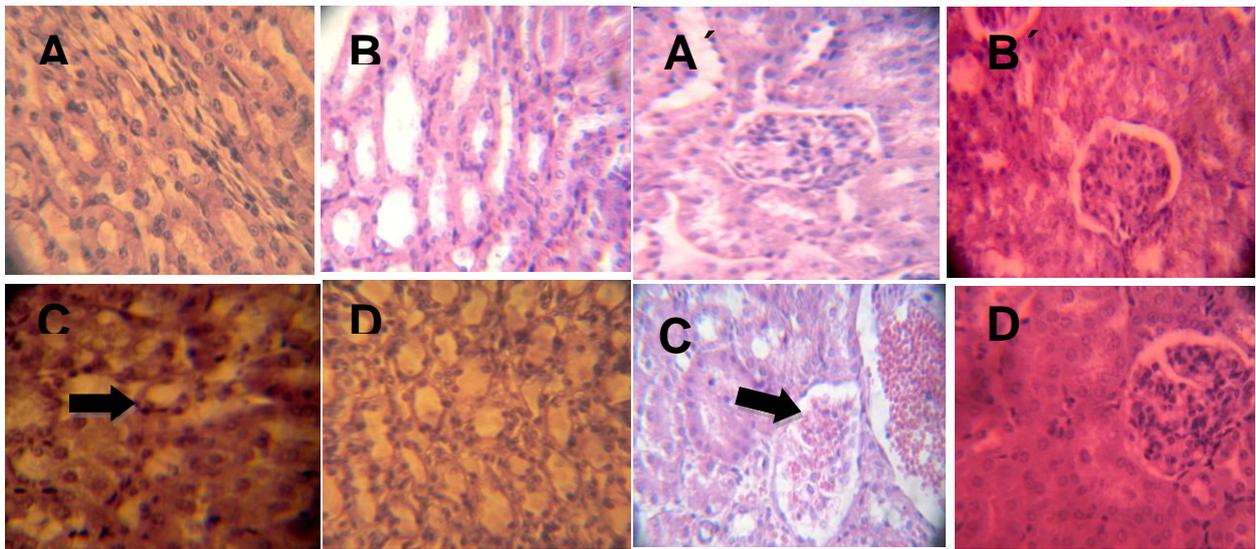


Figura 2. Efecto del CCl₄ y *Chlorella vulgaris* sobre el peso de los ratones. Los resultados presentan la media ± el error estándar * $P < 0,05$ vs grupo control ANOVA Unifactorial y Student Newman-Keuls *post hoc*.

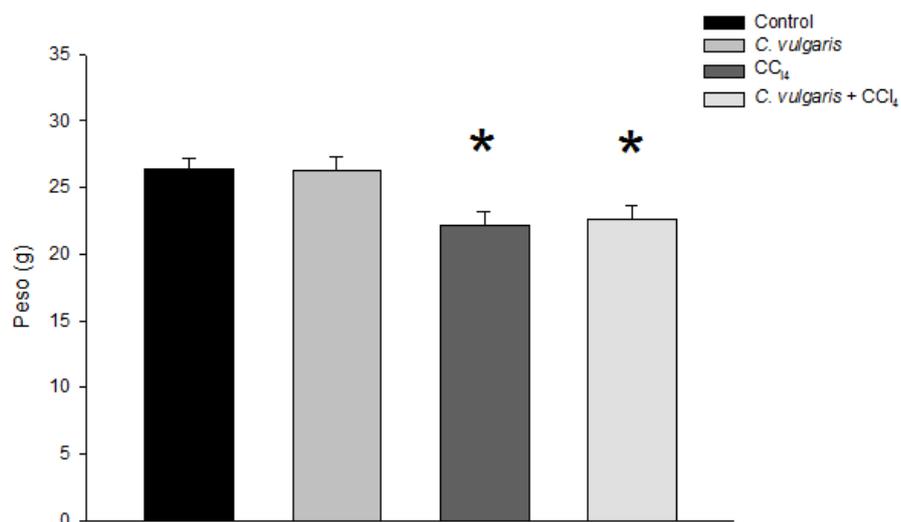


Figura 3. Efecto del CCl_4 y *Chlorella vulgaris* sobre la actividad de la LDH sérica. Los resultados presentan la media \pm el error estándar. * $P < 0,05$ vs grupo control ANOVA unifactorial y Student Newman-Keuls *post hoc*.

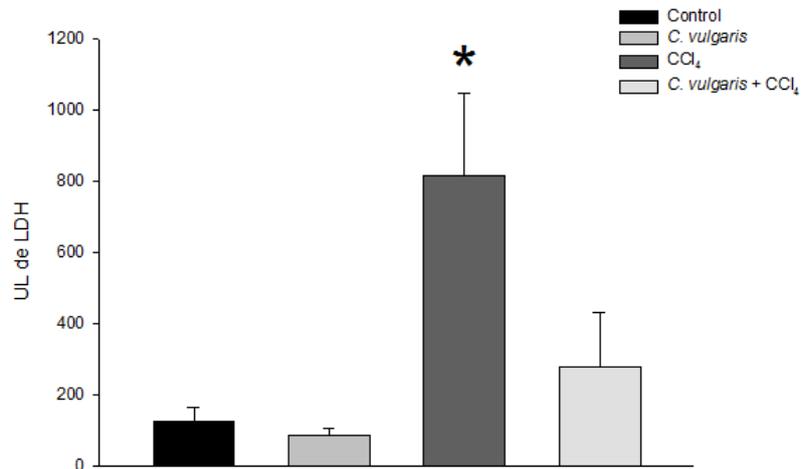


Figura 4. Cuantificación de la peroxidación de lípidos del riñón. Se representa la media \pm EE. * $P < 0,05$ vs grupo control ANOVA unifactorial y Student Newman-Keuls *post hoc*.

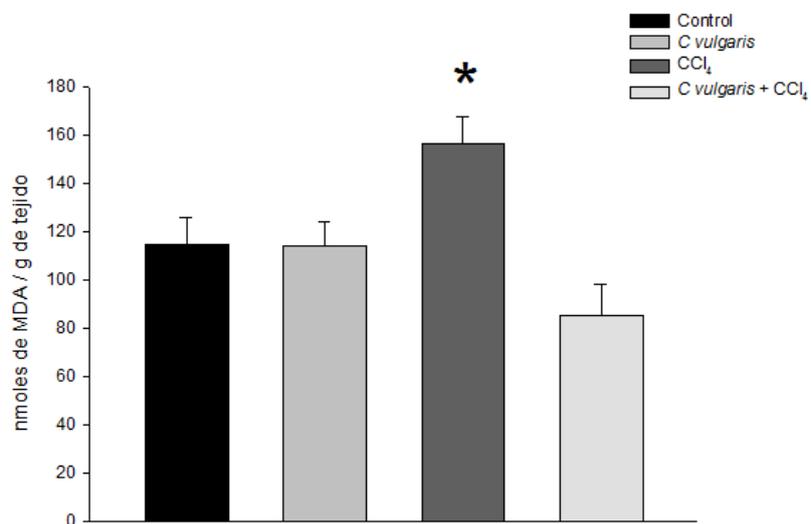


Figura 5. Cuantificación de la actividad de la catalasa del riñón. Se representa la media \pm EE. * $P < 0,05$ vs grupo control ANOVA unifactorial y Student Newman-Keuls *post hoc*.

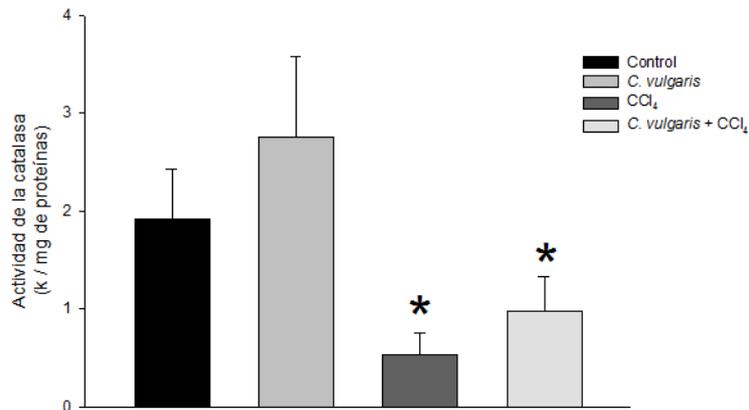
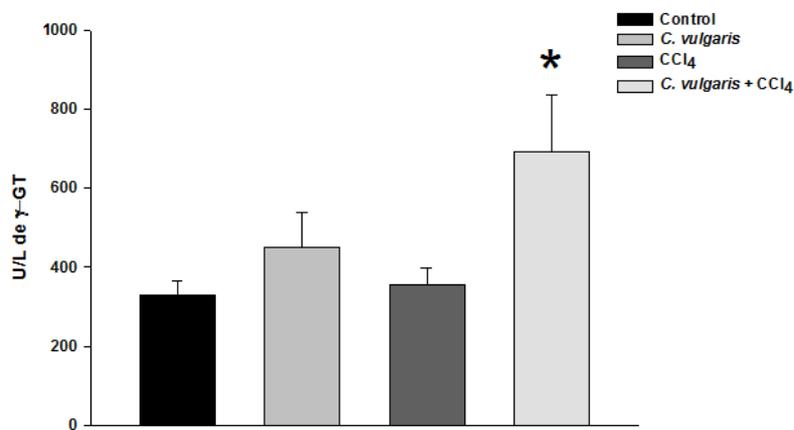


Figura 6. Cuantificación de la actividad de la γ -GT del riñón. Se representa la media \pm EE. * $P < 0,05$ vs grupo control ANOVA unifactorial y Student Newman-Keuls *post hoc*.



Bibliografía

1. Aebi, H. Catalase in vitro. 1984. *Methods Enzymol*; 105:121-126.
2. Albano, E., Carini, R., Parola, M., Bellomo, G., Goria-Gatti, L., Poli, G., Dianzani, MU. 1989. Effects of carbon tetrachloride on calcium homeostasis: a critical consideration. *Biochem. Pharmacol*; 38:2719-2724.
3. Ashkar, S; Binlkey, F; Jonas, DP. 1981. Resolution of a renal sulfhydryl (glutathione) oxidase from gamma-glutamyltransferase. *FEBS Lett*; 124:166-168.
4. Blas-Valdivia, V; Ortiz-Butrón, R; Pineda-Reynoso, M; Hernández-García, A; Cano-Europa, E. 2009. *Chlorella vulgaris* administration prevents HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. *J Appl Phycol*; In Press.
5. Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*; 72:248-254.
6. Cano-Europa, E; Blas-Valdivia, V; Franco-Colin, M; Gallardo-Casas, C. A; Ortiz-Butron, R. 2011. Methimazole-induced hypothyroidism causes cellular damage in the spleen, heart, liver, lung and kidney. *Acta Histochem*; 113:1-5.
7. Esterbauer, H; Schaur, RJ; Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med*; 11:81-128.
8. Gallardo-C, CA; Cano-E, E; López-G, GE; Blas-V, V; Olvera-R, R; Franco-C, M; Ortiz-B, R. 2010. Las ficobiliproteínas de *Spirulina maxima* y *Pseudanabaena tenuis* protegen contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el Hg²⁺. 41 2:30-35.

9. Ohkawa, H., Ohishi, N; Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*; 95:351-358.
10. Olagunjua, JA; Adeneyeb, BS; Fagbohunkac, NA; Bisugac, AO; Ketikuc, AS; Benebod, OM; Olufowobic, AG; Adeoyec, MA; Alimic, AG. 2009. Nephroprotective activities of the aqueous seed extract of *Carica papaya* Linn. in carbon tetrachloride induced renal injured Wistar rats: a dose- and time-dependent study. *Biol and Med*; 1: 11-19.
11. Peng, HY; Chu, YC; Chen, SJ; Chou, ST. 2009. Hepatoprotection of *Chlorella* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *In Vivo*; 23:747-754.
12. Queiroz, ML; Rodrigues, AP; Bincoletto, C; Figueiredo, CA; Malacrida, S. 2003. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol*; 3:889-900.
13. Rincon, AR; Covarrubias, A; Pedraza-Chaverri, G; Poo, JL; Armendariz-Borunda, J; Panduro, A. 1999. Differential effect on CCl₄ on renal function in cirrhotic and non-cirrhotic rats. *Exp Toxicol Pathol*; 51 3:199-205.
14. Rodríguez-García, I; Guil-Guerrero, JL. 2008. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation food. *Food Chem*;108:1023-1026.
15. Showkat, AG; Ehtishamul, H; Akbar, M; Mohmmad, AZ. 2010. Amelioration of carbon tetrachloride induced oxidative stress in kidney and lung tissues by ethanolic rhizome extract of *Podophyllum hexandrum* in Wistar. *Journal of Med Plants Res*; 4 16:1673-1677.
16. Striker, Gary E; Smuckler, Edward A., Kohnen, Paul W; Nagle, Ray B. 1986. Structural and Functional Changes in Rat Kidney During CCl₄ Intoxication. Renal Changes with CCL₄; 53(5):769-789.
17. Symonik-Lesiuk, S; Czechowska, G; Stryjecka-Zimmer, M; Slomka, M; Madro, A; Celinski, K; Wielosz, M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione

peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication.

Journal of Hep. and Pancr. Surgery; 10: 309– 315

- 18.** Young Kang, K; Woo Kim, J. 2009. Chitosan Oligosaccharides Prevent CCl₄-induced Nephrotoxicity in the Rat Kidney. Chitin Chitosan; 14(3):149-154

Recibido: 09/02/11

Aceptado: 22/02/11