

00551 6

2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Química
División de Estudios de Posgrado**

**EFFECTO DEL AJO EN POLVO SOBRE
EL SINDROME NEFROTICO Y LA
HIPERTENSION**

TESIS

**Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOQUIMICAS)**

presenta

María de los Angeles Granados Silvestre



México, D. F.

243491

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

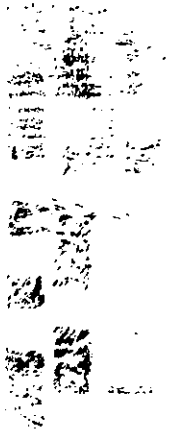
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

P AGILIZACION

D ISCONTINUA



Esta tesis se realizó en el laboratorio 209 del departamento de Biología de la Facultad de Química UNAM, bajo la tutoría del Dr. José Pedraza Chaverri.
Este trabajo fue apoyado por un donativo de DGAPA (IN203797)

Agradecimientos

Agradezco profundamente la asesoría y apoyo del Dr. José Pedraza Chaverri para la elaboración de este trabajo.

Agradezco también la colaboración de mis compañeros y amigos del laboratorio 209 de la Facultad de Química, quienes me ayudaron incondicionalmente.

Y finalmente agradezco el apoyo moral de un gran amigo mío, compañero inseparable de mi vida y que gracias a Dios y a él tengo la fortuna de vivir, mi Padre, el Sr. Jerónimo Granados Moreno.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
I. INTRODUCCION	1-24
II. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	25
III. OBJETIVOS	26
IV. HIPOTESIS	27
V. MATERIAL Y METODOS	28-35
1. Reactivos	28
2. Diseño experimental	29-30
3. Determinaciones analíticas	31-35
4. Análisis estadístico	35
VI RESULTADOS	36-48
1. Efecto del ajo sobre la nefrotoxicidad inducida por ANP	36-42
2. Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de CAT con ATZ sobre la magnitud del SN	42-48
VII. RESUMEN DE RESULTADOS	49
VIII. DISCUSION	50-58
IX. CONCLUSIONES	59
X. BIBLIOGRAFÍA	60-70

Abreviaturas

Especies reactivas de oxígeno	ERO
Anión supeóxido	O_2^-
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	OH^\cdot
Mieloperoxidasa	MOP
Superóxido dismutasa	SOD
Superóxido dismutasa de manganeso	MnSOD
Superóxido dismutasa de cobre y zinc	CuZnSOD
Superóxido dismutasa extracelular	EcSOD
Glutación peroxidasa	GSH-Px
Glutación reducido	GSH
Glutación oxidado	GSSG
Glutación reductasa	GSH-Rx
Catalasa	CAT
Síndrome nefrótico	SN
Aminonucleósido de puomicina	ANP
Oxido nítrico	ON
Sintasa de óxido nítrico	SON
Guanosin monofosfato cíclico	GMPc
Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido	NADPH
N ω -nitro-L-arginina-metil éster	L-NAME
Ratas control	CT
Ratas nefróticas	SN
Ratas alimentadas con ajo en polvo al 2%	CTA
Ratas nefróticas alimentadas con ajo en polvo al 2%	SNA
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	TBARS
3 amino-1,2,4 triazole	ATZ

RESUMEN

a) Modelo de nefrotoxicidad por aminonucleósido de puromicina.

Hay evidencias que las especies reactivas de oxígeno (ERO) participan en el síndrome nefrótico (SN) inducido por aminonucleósido de puromicina (ANP) y que un aumento en los sistemas antioxidantes internos o la ingestión de sistemas antioxidantes podrían tener un efecto benéfico, tal podría ser el caso del ajo en polvo que posee propiedades antioxidantes. En este trabajo se estudió el efecto de una dieta con ajo en polvo al 2% sobre el SN inducido por ANP (75 mg/Kg), en un modelo de ratas, midiendo proteinuria, depuración de creatinina, determinaciones bioquímicas en suero como proteínas totales, albúmina, creatinina, urea y colesterol, así como las actividades renales de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa total (SOD), superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZn-SOD), superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) así como la actividad plasmática de GSH-Px. También se midió la cantidad de H_2O_2 *in vivo* y lipoperoxidación renal.

Se estudiaron cuatro grupos de ratas: grupo CT, ratas con alimento estándar; grupo CTA, ratas con alimento con polvo de ajo al 2%; grupo SN, ratas con alimento estándar y ANP (75 mg/Kg); grupo SNA, ratas con alimento con polvo de ajo al 2% y ANP (75 mg/Kg).

No hubo cambios en los niveles de proteinuria en las ratas nefróticas alimentadas con polvo de ajo. Esta dieta tampoco tuvo un efecto sobre la depuración de creatinina, lipoperoxidación renal, determinaciones bioquímicas en suero y actividad renal y plasmática de GSH-Px. La actividad renal de SOD total disminuyó en el grupo SN a expensas de la fracción CuZn-SOD y la dieta con polvo de ajo impidió esta disminución en el grupo SNA. La actividad de CAT disminuyó en los grupos nefróticos. Además, en el grupo CTA, la actividad de CAT y la cantidad de H_2O_2 *in vivo* fueron significativamente menores que en el grupo CT. Se encontró un incremento en la cantidad de H_2O_2 *in vivo* 10 días después de la inyección de ANP en los grupos SN y SNA. La dieta con polvo de ajo no bloqueó este incremento. No obstante haber observado la capacidad antioxidante del polvo de ajo a través de la disminución en los niveles renales de H_2O_2 , éste no fue capaz de disminuir el daño renal en el SN inducido por ANP.

Para confirmar adicionalmente la participación de H_2O_2 en el SN por ANP en este trabajo se exploró el papel *in vivo* del H_2O_2 en la patogénesis del ANP inhibiendo CAT con 3-amino-1,2,4 triazole (ATZ) 24 horas antes de la inyección de ANP. Se encontró una exacerbación en la proteinuria y la hipercolesterolemia en el grupo tratado previamente con ATZ comparado con el inyectado únicamente con ANP. Estos resultados nos sugieren la participación activa del H_2O_2 en el SN inducido por ANP.

b) Modelo de hipertensión inducido por N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME).

El ON ejerce un efecto vasodilatador en la microcirculación y la inhibición continua de su síntesis ocasiona un predominio de factores vasoconstrictores, originando una hipertensión arterial similar a la observada después de la infusión crónica de angiotensina II, norepinefrina o tromboxanos {2091}.

La liberación de neurotransmisores y su efecto sobre las células endoteliales estimulan la síntesis de óxido nítrico {4726}. Se conoce que el ajo activa la sintasa de óxido nítrico *in vitro*, y que la administración crónica de L-NAME, un inhibidor de esta sintasa, produce hipertensión arterial. En este trabajo, estudiamos el efecto de una dieta con ajo en polvo al 2% sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratas, durante cuatro semanas. Se midió la presión arterial cada semana, así como la excreción urinaria de nitritos y nitratos, como marcadores de la activación de la sintasa de óxido nítrico.

Se estudiaron cuatro grupos de ratas; grupo CONTROL, ratas con alimento estándar; grupo L-NAME, ratas con alimento estándar+L-NAME; grupo AJO, ratas con alimento con ajo en polvo; grupo AJO+L-NAME, ratas con alimento con ajo en polvo+L-NAME. En el grupo L-NAME la presión arterial aumentó 34%, y la excreción urinaria de nitratos y nitritos disminuyó 59%. En el grupo AJO+L-NAME encontramos un bloqueo del incremento de la presión por L-NAME, y de la disminución en la excreción urinaria de nitratos y nitritos. Además, las ratas del grupo AJO tuvieron una mayor excreción urinaria de nitratos y nitritos que el grupo control. Estos dos datos apoyan fuertemente que el polvo de ajo activa *in vivo* a la sintasa de óxido nítrico.

En un grupo adicional se investigó, si el polvo de ajo era capaz de revertir el efecto del L-NAME. Las ratas se alimentaron con alimento estándar y L-NAME durante dos semanas, se midió la presión los días 7 y 14. Al finalizar estas dos semanas, se subdividieron en dos grupos, a uno de los cuales, se les cambio la dieta a alimento con polvo de ajo y el otro siguió con alimento estándar. A ambos grupos se les mantuvo la administración de L-NAME y se les midió la presión los días 21 y 28. La presión sistólica de las ratas a las que se les cambio la dieta, disminuyó, aunque esta presión no alcanzó los niveles normales. Este hallazgo sugiere que el polvo de ajo puede revertir, al menos parcialmente, la hipertensión en este modelo experimental.

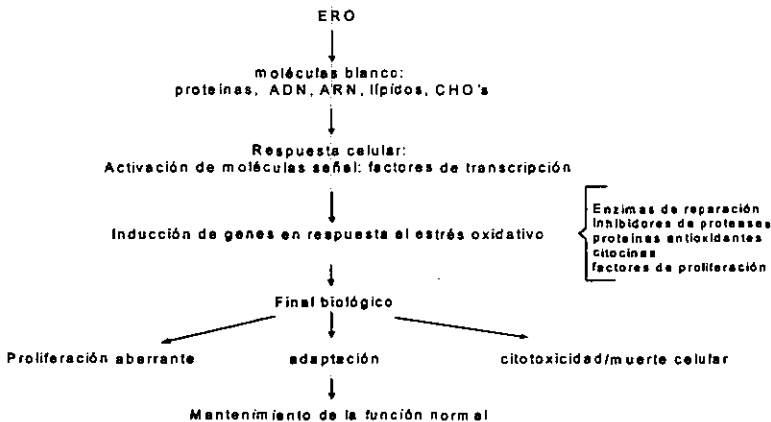
I. INTRODUCCION

Aspectos generales

Las moléculas que participan en las reacciones químicas como aceptores de electrones son conocidas como oxidantes o radicales. Esta propiedad se debe a que en su orbital más externo se encuentran uno o más electrones desapareados en un giro paralelo. Son altamente reactivas ya que buscan completar su último par electrónico, reaccionando con otro radical o sustrayendo electrones a otra especie convirtiéndola a su vez en radical. En este contexto, el oxígeno bimolecular (O_2) es un biradical, ya que cada átomo de oxígeno posee en su último orbital un electrón desapareado.

Especies reactivas del oxígeno

La reducción incompleta del oxígeno bimolecular genera metabolitos intermediarios conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO). Estos son el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el singulete de 1O_2 . Estas especies son generadas durante los procesos biológicos normales por las células como supproductos de las cadenas de electrones o son producidos específicamente para cumplir funciones fisiológicas, entre las que se encuentran oxidación de xenobióticos, regulación del factor de relajación del músculo liso y eliminación bacteriana en los procesos infecciosos (1). Además, también actúan sobre una gran cantidad de moléculas biológicas como las proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos y carbohidratos (2) (Esquema 1).



Esquema 1. Respuesta celular al daño oxidativo (2)

Es por ello que los organismos cuentan con un multisistema enzimático, a través del cual son capaces de transformar estas especies reactivas del oxígeno a H_2O . Cuando se rompe este equilibrio y/o los sistemas productores de ERO sobrepasan la capacidad neutralizante de los sistemas enzimáticos antioxidantes, sobreviene la disfunción local o generalizada.

Existe una variedad de condiciones patológicas en las que se cree que están involucradas las ERO, como por ejemplo: cáncer, artritis reumatoide, enfermedades respiratorias como fibrosis pulmonar, isquemia-reperusión y enfermedades mediadas por complejos inmunes (2). Se tienen evidencias que las ERO juegan un papel muy importante en el origen de algunas enfermedades renales como glomerulonefritis por anticuerpos anti membrana basal (3), nefritis nefrotóxica (4), nefropatía crónica por ANP (5-7), síndrome nefrótico de cambios mínimos, nefropatía por lupus, glomerulonefritis postestreptocócica, nefropatía por IgA (8), y falla renal aguda (9).

Formación de las especies reactivas de oxígeno

Anión superóxido (O_2^-). Esta especie se forma cuando el oxígeno (O_2) recibe un solo electrón. Bajo condiciones normales, el O_2^- es producido en bajas concentraciones por el metabolismo celular, por autooxidaciones de hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, tioles, tetrahidopterinas y hemoglobina; también los citocromos P_{450} y b5 localizados en retículo endoplásmico generan O_2^- por autooxidación, ambos citocromos presentan una gran actividad en presencia de NADPH (citocromo 450) o NADH (b5). En todos los casos el producto primario formado es O_2^- . Numerosas enzimas localizadas en el citosol, mitocondria y peroxisomas, así como en la membrana plasmática, generan ERO durante su ciclo catalítico. La xantina oxidasa, que está presente en el riñón, genera O_2^- durante la reducción de O_2 a H_2O . La mayor parte de las ERO producidas por mitocondria provienen de la cadena de transporte de electrones localizadas en el interior de la membrana. Los peroxisomas contienen altas concentraciones de oxidasas que pueden ser fuente de ERO (10). El anión O_2^- también se origina durante la descarga respiratoria de los procesos fagocíticos de las células de defensa inmunológica, a través de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa (11). Se ha observado *in vitro*, que este radical puede atravesar la membrana de los eritrocitos usando canales aniónicos, pero esto no se ha documentado en otras células (12).

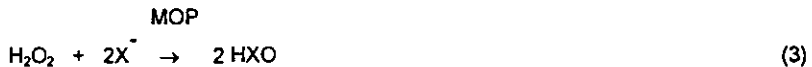
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se genera por la acción de la enzima SOD sobre el anión O_2^- . En solución acuosa, el O_2^- dismuta de manera espontánea (11) generando H_2O_2 y oxígeno singulete.

Estrictamente, el H_2O_2 no es un radical libre porque no posee electrones desapareados, sin embargo al participar en la reacción de Haber-Weiss (reacciones 1 y 2), genera radicales hidroxilo o interactúa con halógenos y el sistema mieloperoxidasa para producir ácidos como el ácido hipocloroso, ácido hipobromoso, etc. (reacción 3) (13).

Reacción de Haber-Weiss



Producción de ácidos derivados de halógenos por el sistema de mieloperoxidasa (MOP)



Radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Se genera por la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del H_2O_2 lo cual da como resultado 2 radicales hidroxilo, también puede formarse por la reacción de Haber-Weiss o por la reacción de Fenton (reacción 4).

Reacción de Fenton



donde M es un metal de transición como Fe^{3+} o Cu^{2+}

La membrana celular contiene fosfolipasas A_2 y C, las cuales catalizan la conversión de fosfolípidos a ácido araquidónico, que es la oxidación enzimática de ácidos grasos insaturados vía ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Esta vía es tentativamente la generadora de hidroxiradicales en condiciones fisiológicas. Ambas enzimas están presentes en el riñón, la ciclooxigenasa se encuentra en todas las células renales especialmente en las del glomérulo, mientras que la lipooxigenasa está menos distribuida y su estudio se ha centrado esencialmente en el glomérulo (10). Por otra parte, el O_2^{\cdot}

puede reaccionar con el óxido nítrico generando el peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) el cual, al hidrolizarse se escinde en una molécula de radical hidroxilo y una de bióxido de nitrógeno (reacción 5) (14).

Vía de generación del radical hidroxilo a través del peroxinitrito



Singlete de oxígeno (1O_2). Esta especie química, como no tiene electrones desapareados, no constituye realmente un radical de O_2 , pero es muy reactivo, se forma cuando algunos pigmentos son iluminados en presencia de oxígeno o por la reacción del ácido hipocloroso con el H_2O_2 (reacción 6). Presentan una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo en los lípidos de las membranas (15).



Origen celular de las especies reactivas de oxígeno

Los neutrófilos y monocitos presentan un marcado metabolismo oxidativo, lo cual lleva a generar una gran cantidad de ERO en respuesta a la perturbación de su membrana plasmática por una variedad de partículas solubles o estímulos específicos. Por otra parte, se sabe que las células glomerulares son capaces de originar ERO en las formas no inflamatorias de enfermedad renal, debido a que existen células semejantes a las fagocíticas en el glomérulo, en particular, las células mesangiales, las cuales aumentan la generación de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 en respuesta a varios estímulos como el zimosán, complejos inmunes, factor activador de plaquetas, mediadores de la inflamación y por aminonucleósido de puromicina (16,17). En respuesta a esta última sustancia, las células epiteliales en cultivo incrementan la generación de H_2O_2 (5).

Defensas naturales contra los radicales libres generados en condiciones fisiológicas

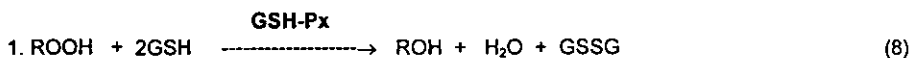
Una de las exigencias de la aerobiosis es contar con sistemas de defensa contra los radicales de oxígeno, que tiendan a impedir su formación o a neutralizarlos, que quiere decir metabolizarlos a especies menos reactivas o no reactivas una vez formados. El primero de éstos corresponde a una reducción tetravalente del oxígeno, lo cual se logra mediante el sistema citocromo oxidasa, que lleva a cabo la reducción de más del 90% del oxígeno en el organismo. Este sistema es capaz de efectuar esta reducción hasta agua, sin liberar intermediarios, ya que estos se quedan unidos al sitio activo de la enzima (18) (Esquema 2).

Cuadro 1. Características de las isomorfas de SOD

isomorfa	localización	estructura	peso molecular total
EC Cu-Zn/SOD (rata)	extracelular	dímero	85 kDa
EC CU-Zn/SOD (humano)	extracelular	tetrámero	135 kDa
Cu-Zn/SOD	citósol	dímero	34 kDa
Mn/SOD	matriz mitocondrial	tetrámero	80 kDa

Glutación peroxidasa (GSH-Px) (glutación: H₂O₂ oxidoreductasa, EC 1.11.1.9)

El H₂O₂, producto de la reacción de la SOD, es transformado por hidropoxidases como la GSH-Px (GSH-Px), descrita por primera vez por Mills en 1957. Esta enzima cataliza la descomposición del H₂O₂ o de otros peróxidos orgánicos con la concomitante oxidación del glutación reducido (GSH) transformándose en glutación oxidado (GSSG) (reacción 8). El GSSG es, a su vez, reducido a GSH por la glutación reductasa (GSH-Rx) en presencia de NADPH formando un ciclo redox e impidiendo que se agoten las reservas de GSH (reacción 9) (25,26). Los niveles de NADPH son regenerados por la acción de las enzimas málica y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



Se conocen diferentes isomorfas de esta enzima la cual contiene en su sitio activo un átomo de selenio (Cuadro 2).

GSH-Px citosólica (cGSH-Px). Es una enzima tetramérica (27) que sólo tiene actividad antioxidante en casos de un incremento de H₂O₂ y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra una baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol.

GSH-Px extracelular (pGSH-Px). Es una enzima glicosilada, se sintetiza en riñón y pulmón, su ARNm se ha encontrado en células de epitelio tubular proximal y en células parietales de la cápsula de Bowman; se piensa que tiene un papel importante en la protección del riñón durante el daño oxidativo (28), sin embargo, su función no ha sido bien establecida ya que su sustrato (GSH) está en muy bajas concentraciones (0.3 μM) en el plasma (27,29). Está constituida por 226 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25 kDa; esta enzima esta presente en la circulación como un homotetrámero (30).

GSH-Px gastrointestinal (giGSH-Px). Se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal de los roedores y en el humano también se ha encontrado en el hígado y colon (27), la secuencia de su ADNc predice que está constituida por 190 aminoácidos (31). Inmunológicamente esta enzima no reacciona con los anticuerpos contra la GSH-Px ya sea extracelular o citosólica (31); se piensa que tiene un papel de protección contra efectos adversos en la ingesta de hidroxiperóxidos (27).

GSH-Px de fosfolípidos (EC 1.11.1.12)(PIGSH-Px). Es una hidroxiperoxidasa de fosfolípidos, está unida a membranas intracelulares y tiene una menor afinidad por GSH, su actividad se encuentra mejor preservada en casos de deficiencia de selenio, es abundante en testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (32). Se ha reportado que reduce hidropéroxidos de colesterol y al 7β-hidropéroxido de colesterol, uno de los compuestos más citotóxicos de las lipoproteínas estudiadas (33). En todos los casos, con excepción de la PIGSH-Px que es un monómero, todas las isomorfas de GSH-Px son tetrámeros; el riñón contiene 7.5% de la concentración total de selenio encontrado en tejidos de rata y la actividad de la GSH-Px en este órgano es de aproximadamente un 2.0% de la total (34).

Cuadro 2. Características de las isomorfas de GSH-Px. Todas son productos de genes diferentes (30,31,35)

Isomorfa	Localización	Estructura	Peso molecular total
cGSH-Px	citosol	tetrámero	84 kDa
plGSH-Px	extracelular	tetrámero	100 kDa
giGSH-Px	gastrointestinal	tetrámero	75 kDa
PIGSH-Px	membranas	monómero	21 kDa

Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

La CAT es una hemoproteína tetramérica con un peso de 240 kDa, con cuatro ferriprotoporfirinas por molécula (36) y su vida media en la circulación es relativamente corta, de 6 a 8 minutos (37). Está presente en los peroxisomas y posee una doble función: a la descomposición del H₂O₂ en O₂ y H₂O (reacción 10) se le conoce como actividad catalítica, y como actividad de peroxidasa (reacción 11) a la oxidación de donadores de protones como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles, con el consumo de 1 mol de peróxido (38). En tejidos de mamíferos la CAT está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (39). En general en las células, está presente principalmente en los peroxisomas (80%) y mitocondrias, mientras que en los eritrocitos existe en una forma soluble (36). Esta enzima presenta una heterogeneidad molecular, que puede ser de origen genético, lo cual produce cambios en su conformación (por oxidaciones de grupos SH), que pueden llevarla a la disociación del tetrámero activo, lo que la convierte en un dímero, el cual tiene actividad peroxidativa pero no catalítica (36).



Las reacciones catalíticas de esta enzima poseen una κ de alrededor de 10^7 mol/litros⁻¹/seg⁻¹, mientras que las peroxidativas tienen aproximadamente una κ de 10^2 - 10^3 . La reacción predominante dependerá de la concentración del donador de protones, así como de la concentración basal y/o de la producción de H_2O_2 por el sistema (36).

Antioxidantes no enzimáticos vs radicales OH^\cdot

En contraste con el ion superóxido y el H_2O_2 , no se conocen enzimas capaces de regular directamente las concentraciones de radicales OH^\cdot . A través de las enzimas antioxidantes, los organismos son capaces de eliminar las sustancias precursoras de este radical, antes de que sea formado. Sin embargo, éste radical puede ser neutralizado por la vitamina E o alfa-tocoferol, que es un antioxidante excelente, y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde la protección que le confiere a la membrana es particularmente efectiva (15). La vitamina E y otros antioxidantes fenólicos interrumpen el proceso de lipoperoxidación inhibiendo la etapa de propagación, puesto que reaccionan con los radicales peroxilo generando productos que no son radicales (40).

Función renal

La unidad funcional del riñón es la nefrona, la cual, está formada por un conjunto de túbulos y un glomérulo. El glomérulo se origina por la invaginación de una madeja de capilares en el extremo dilatado y ciego de la nefrona (cápsula de Bowman). Los capilares están irrigados por una arteriola aferente y drenados por una arteriola eferente. En la cápsula de Bowman la sangre está separada del filtrado glomerular por dos capas de células: el endotelio capilar y el epitelio especializado que yace encima de los capilares glomerulares. Estas capas están separadas por la membrana basal glomerular. Las células endoteliales fenestradas, la membrana basal glomerular y las células epiteliales forman en conjunto la barrera de filtración glomerular. Otras células en forma de estrella, llamadas células mesangiales, envían prolongaciones entre el endotelio y la lámina basal, son contráctiles y participan en la regulación de la filtración glomerular.

El endotelio de los capilares glomerulares es fenestrado, con poros de aproximadamente 100 nm de diámetro. Las células del epitelio (podocitos), tienen numerosos pseudópodos que se entrelazan para

formar rendijas de filtración de aproximadamente 25 nm de amplitud a lo largo de la red capilar (procesos podocíticos). La membrana basal no tiene huecos o poros visibles.

Funcionalmente, la membrana basal glomerular permite el libre paso de sustancias neutras de hasta 4 nm de diámetro y excluye en su totalidad aquellas con un diámetro mayor de 8 nm. La filtración es inversamente proporcional al diámetro. Sin embargo, las sialoproteínas en la pared capilar glomerular tienen carga eléctrica negativa y los estudios con dextranos cargados negativa o positivamente indican que las cargas negativas repelen sustancias con carga negativa en la sangre. Esto tiene como consecuencia que la filtración de aniones de 4 nm de diámetro es menor que la mitad de la filtración de las sustancias neutras del mismo tamaño. Esta es la explicación de porque la filtración de la molécula de albúmina, una proteína con carga negativa, es menor a la esperada por una molécula de diámetro menor de 7 nm. Por el contrario, la filtración de las sustancias catiónicas es mayor que la de las sustancias neutras del mismo tamaño.

Síndrome nefrótico (SN)

El SN es el resultado de un incremento en la permeabilidad glomerular. Está caracterizado por proteinuria, hipoalbuminemia, hiperlipidemia, edema e hipercoagulabilidad. La proteinuria es la manifestación más temprana y es seguida por la acumulación de ascitis (41,42).

La pérdida de albúmina por orina es un factor importante que contribuye a explicar la aparición de hipoalbuminemia, sin embargo, ésta no es la única causa, sino que también hay un mayor catabolismo de esta proteína en el túbulo proximal y un aumento insuficiente de su síntesis, lo que impide contrarrestar la pérdida urinaria o el incremento del catabolismo. También podrían participar cambios en la distribución corporal y una disminución en la ingesta de proteínas (43,44).

En el SN están elevadas casi todas las fracciones de lípidos y lipoproteínas séricas. La síntesis de colesterol aumenta en respuesta a la hipoalbuminemia y a la elevación del ácido mevalónico, que a su vez, se debe a una disminución de su catabolismo renal (41).

El SN se presenta en diferentes padecimientos entre los que se encuentran algunas enfermedades crónicas degenerativas e inmunológicas como lupus y diabetes, o puede presentarse como un efecto secundario a algunos alérgenos o fármacos. Por otra parte, existe un porcentaje de casos de SN, en donde no se conoce la etiología, y se le denomina SN idiopático. En este contexto se encuentra la enfermedad de cambios mínimos (ECM), que es la causa más frecuente de SN en niños (43).

Existen evidencias que sugieren un desequilibrio entre el estrés oxidativo y los mecanismos de defensa antioxidante en las patologías glomerulares, entre las que se encuentra la ECM. Los cambios en los niveles de lipoperoxidación, la disminución en las actividades de algunas enzimas antioxidantes como SOD total y CAT, y el incremento del cociente GSSG/GSH reflejan un aumento del estrés oxidativo en estos padecimientos (3,18,45-47). Se ha demostrado que existe una

disminución en la actividad de SOD total en pacientes con nefropatía por inmunoglobulina A y que esta disminución se debe a que, la actividad y la concentración de ARNm de la isomorfa de CuZn-SOD está en menor proporción con respecto a los controles (48). Asimismo, en células mononucleares periféricas de pacientes con SN idiopático, se encontró una disminución del 42% y del 59% en la actividad y expresión del ARNm de Mn-SOD respectivamente (49).

SN mediado por ANP

Para la mejor comprensión de los orígenes y mecanismos de esta patología se han desarrollado modelos experimentales. El modelo más usado es el inducido con aminonucleósido de puromicina (ANP) (6-dimetilaminopurina-3-amino-d-ribosa). La puromicina es un antibiótico obtenido de *Actinomyces alboniger*. Estudios farmacológicos indican que tiene un bajo nivel de nefrotoxicidad y, al igual que su nucleósido, tiene efectos antiparasitarios. Sin embargo, el ANP origina SN por una sola inyección intravenosa o subcutánea en ratas (150 mg/Kg), dando como resultado una marcada proteinuria y cambios morfológicos glomerulares que son similares a la ECM en el humano (50-52). Hay modelos experimentales en donde el daño renal puede ser tanto de tipo agudo como crónico. En el modelo agudo, el daño que se produce es reversible, mientras que en el modelo crónico, el daño es irreversible y el resultado de la persistencia de la proteinuria es el desarrollo de la glomerulosclerosis. El daño al epitelio celular del glómerulo parece ser la razón primaria para desarrollar proteinuria en la nefrosis por ANP. Entre los cambios morfológicos se encuentra la transformación de las microvellosidades, vacuolización celular y disminución de los procesos podocíticos (53). El ANP origina defectos en cuanto a la selectividad del paso de moléculas por tamaño y carga, ya que existe una modificación en los sitios polianiónicos (sialoglicoproteínas y heparán-sulfato-proteoglicanos) de la membrana basal glomerular. Se ha observado también que en la membrana basal glomerular dañada, existen grandes áreas desprovistas de células epiteliales y de diafragmas de filtración, lo que se cree que origina el paso de grandes moléculas al espacio urinario. La proteinuria comienza entre el 6° y 8° día después de la inyección de ANP, y es generalmente masiva en el día 10 (43). Existe hipercolesterolemia como resultado del incremento en su síntesis hepática concomitante a la disminución de proteínas séricas. En el modelo crónico el aumento del colesterol sérico puede desempeñar un papel importante en la progresión del daño glomerular inicial a glomerulosclerosis, ya que se ha demostrado que la hiperlipidemia es un factor nefrotóxico (54-56).

Por otra parte, aunque se conoce que el principal blanco de daño del ANP son las células glomerulares epiteliales, también se ha demostrado que las ERO generadas por ANP alteran la contractilidad de las células mesangiales (57).

Participación de los radicales libres en el SN mediado por ANP

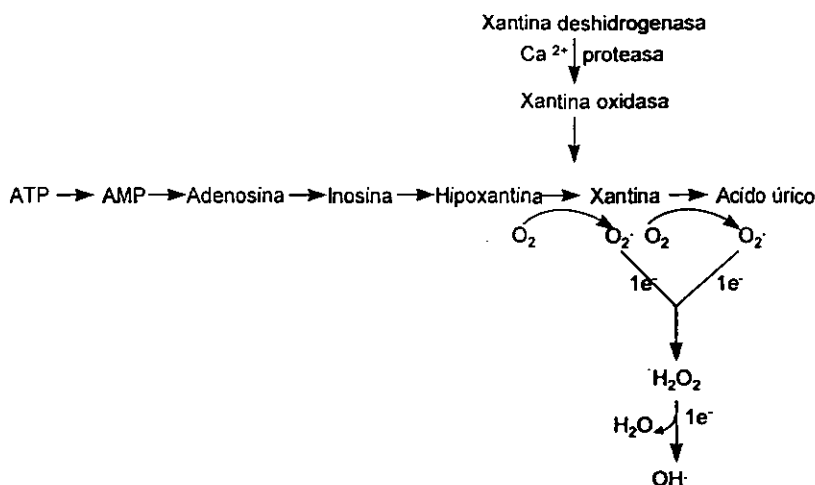
En estudios recientes, se ha postulado el papel de las ERO en el SN inducido por ANP en base a su medición directa o indirecta en este modelo. En el primer contexto Kawaguchi *et al.* (5), encontraron que el ANP, adicionado a cultivos de células glomerulares induce un incremento de H_2O_2 ; por otra parte Ricardo *et al.* (58) encontraron que el ANP adicionado a los glomérulos en cultivo induce la producción de $OH\cdot$ y $O_2\cdot$. Cuando esta tesis se estaba elaborando, se publicó un trabajo en el que se reportó un incremento en la producción renal de H_2O_2 en ratas tratadas con ANP, este aumento se presenta 15 min después del tratamiento con ANP (59). El papel del H_2O_2 se ha evaluado en el daño renal cuando se ha infundido éste directamente por la vena renal provocando con ello una proteinuria masiva (60). La cuantificación de los productos de lipoperoxidación como el malondialdehído (MDA), es otra forma directa de evaluar la participación de las ERO en este modelo, debido a que sus niveles aumentan tanto en el modelo agudo como en el crónico (60-64), el aumento en el MDA precede a la proteinuria, desapareciendo, aún cuando todavía exista excreción de proteínas urinarias. Fawcett *et al.* (65) realizaron un estudio temporal de lipoperoxidación renal en ratas inyectadas con ANP. Encontraron que la lipoperoxidación aumenta desde el día 2 y alcanza su máximo en el día 4 después de la inyección del ANP; y regresa a los niveles basales el día 10. En estas mismas ratas la proteinuria aumenta el día 4 y su pico máximo se encuentra en el día 10. Al parecer, la relación entre la aparición de lipoperoxidación seguida por la proteinuria no es casual, lo que sugiere que el daño glomerular en este modelo puede ser mediado a través de la producción de las ERO.

La medida indirecta de la participación de las ERO en el SN inducido por ANP, se ha basado en la protección que pueden proporcionar agentes antioxidantes como el selenio, vitamina E (63,64,66,67), taurina y probucol (6,7,64), inhibidores de la xantina oxidasa como el alopurinol (5,53,68), enzimas antioxidantes como SOD y CAT (5,67-69), quelantes de hierro como la deferoxamina (70) y sustancias que reaccionan con radicales hidroxilo como dimetiltiourea (5,70) y benzoato de sodio (67). Este efecto protector se refleja en la disminución de la proteinuria y de los niveles de malondialdehído en animales, inyectados con ANP, y en la reducción del efecto citotóxico del ANP en cultivos celulares. La administración de glucocorticoides a ratas tratadas con ANP incrementa las actividades de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GHS-Px, y disminuyen la proteinuria y los niveles de malondialdehído (60). Su acción sobre el sistema enzimático antioxidante parece ser la razón de su efecto protector en el SN inducido por ANP. Por otra parte, la disminución de sustancias como el glutatión reducido, que participa directamente en la eliminación de las ERO agrava el SN por ANP, lo que apoya la hipótesis de que estas especies reactivas del oxígeno participan directamente en la producción de daño en este modelo (71).

La participación del H_2O_2 en el SN por ANP presenta algunas controversias, ya que algunos autores han encontrado que la inyección de CAT a animales con ANP (69), o la adición de éste a células en

cultivo tratadas con ANP (5), tiene un efecto protector, mientras que otros autores no han encontrado dicho efecto (68,72).

La vía de generación de las ERO en el modelo de nefrotoxicidad por ANP aún no se ha dilucidado. Se ha postulado que la hipoxantina, que es un producto metabólico intermediario de la degradación del ANP, sirve como sustrato para la xantina oxidasa, la cual cataliza enzimáticamente su conversión a xantina y ácido úrico, con la consiguiente producción de ion superóxido durante el proceso (Esquema 3) (68).



Esquema 3. Vía de generación de ERO por el sistema xantina oxidasa.

Diamond *et al.* (68) encontraron que el alopurinol (un inhibidor de la xantina oxidasa) y la SOD disminuyen la proteinuria en el SN inducido por ANP, lo que sugiere que la generación de iones superóxido por el sistema xantina oxidasa provoca SN (68). Beaman *et al.* (69) confirmaron estos datos en cuanto al efecto protector de la SOD y, además, encontraron que la proteinuria en este modelo, se reduce significativamente en ratas que recibieron el complejo polietilenglicol-CAT, lo que indica que el H_2O_2 está involucrado también en la aparición de SN por ANP. Por otra parte, Nosaka *et al.* (73) encontraron que la nefrotoxicidad del ANP es inhibida cuando se administra 2'-deoxicoformicina, un inhibidor de la adenosina deaminasa. Esta enzima participa en la degradación metabólica de las purinas, y por lo tanto está involucrada en las primeras etapas de la formación de hipoxantina, el sustrato de la xantina oxidasa. Sin embargo, los estudios de Ghiggeri *et al.* (72) sugieren que la vía de generación de ERO no es a través de la xantina oxidasa, porque la concentración renal y urinaria de hipoxantina, xantina y de sus precursores adenosina e inosina, así

como también el ácido úrico y la alantoína, que son los productos finales de la reacción catalizada por la xantina oxidasa, no aumentan en ratas tratadas con ANP. Por otra parte, sus estudios del metabolismo del ANP indican que el mecanismo de acción del ANP es muy rápido, mientras que la conversión de ANP en hipoxantina dentro del glomérulo emplea varias horas (más de dos) (72). Por otra parte, Ricardo *et al.* (53) encontraron que la administración de tungsteno (un inhibidor de la xantina oxidasa), a ratas tratadas con ANP, no indujo una disminución significativa en la proteinuria, pero sí una disminución de la actividad de la xantina oxidasa y de la xantina deshidrogenasa. También encontraron que el alopurinol disminuyó la proteinuria sin disminuir la actividad de la xantina oxidasa. Lo anterior condujo a los autores a sugerir que la protección del alopurinol, no se debe a la inhibición de la xantina oxidasa sino a las propiedades antioxidantes propias del alopurinol, y que esta vía no es la fuente principal de las ERO en el SN inducido por ANP (53). Por otra parte, la adición de hipoxantina a cultivos celulares (58,72), o su inyección a ratas (74) no condujo a un efecto citotóxico en podocitos o proteinuria, respectivamente. Lo anterior ha conducido a sugerir que el ANP puede reaccionar con componentes del ultrafiltrado glomerular como ácido ascórbico, cisteína y Fe^{2+} , para generar ERO (53,72). Tada *et al.* (75) observaron que 84 horas después de la administración de ANP a ratas (150 mg/Kg), la actividad de las enzimas involucradas en la cadena transportadora de electrones en mitocondria renal, como NADP-citocromo c reductasa, succinato citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa, disminuyó, lo que sugiere que el ANP induce una disfunción en este sistema y, por lo tanto, la vía tetravalente de la reducción del oxígeno se afecta, dando como resultado una producción importante de ERO provenientes de mitocondria, que contribuyen al daño renal. Por otra parte, puede pensarse que las células glomerulares puedan producir ERO al entrar en contacto con las moléculas de ANP igual que las células fagocíticas, las cuales producen ERO en respuesta a la perturbación en su membrana.

Efectos de las ERO en SN

La principal manifestación del SN es la proteinuria. Ésta puede ser el resultado del daño a las células epiteliales del glomérulo originado por la activación de metaloproteasas latentes por el ácido hipocloroso o agentes oxidantes similares generados por el sistema de mieloperoxidasa (76). Por otra parte, el defecto estructural responsable de la proteinuria parece ser una disminución en la síntesis *de novo* de proteoglicanos de sulfato de heparán por las células epiteliales, ya que este proceso es altamente susceptible al daño por oxidantes (77,78). La infusión de H_2O_2 , directamente a la arteria renal, provoca proteinuria masiva y un aumento en el flujo plaquetario, disminución de los procesos podocíticos e inchamiento de las células endoteliales que llevan a una lesión glomerular proliferativa (16). Se ha observado un aumento en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos debido a un estímulo de las ERO en glomerulopatías experimentales, lo que sugiere que éstos

pueden ser mediadores importantes de la proteinuria y de la disminución de la filtración glomerular; por lo que se piensa que en los daños glomerulares, donde el mecanismo de radicales libres está involucrado, la formación de prostanoïdes (vasoconstrictores proglomerulares) tiene un papel importante en la reducción de la filtración glomerular (16,17).

Por otra parte, estas ERO presentan actividad directa contra los fosfolípidos de membrana, debido a que poseen una alta reactividad química que les permite oxidar a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, proceso conocido como lipoperoxidación, mecanismo por el cual las especies reactivas de oxígeno causan daño celular. El daño oxidativo en este proceso, se debe a que los enlaces dobles C-C que presentan los fosfolípidos, debilitan la unión C-H, por lo que es más fácil sustraer al átomo de hidrógeno (79,80). El mecanismo de la lipoperoxidación es el siguiente:

El proceso inicia cuando un radical hidroxilo OH^\cdot sustrae de un ácido graso insaturado (LH), un átomo de hidrógeno, dando origen a un dieno conjugado, el cual reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peroxilo LOO^\cdot



El radical peroxilo sustrae a su vez, otro átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado vecino generando así un hidroperóxido de lípido o lipoperóxido que continúa con la reacción.



Los metales de transición, particularmente el hierro, desempeñan un papel importante en la generación de los radicales peroxilo catalizando las reacciones de propagación, en las cuales la reducción de un hidroperóxido de alquilo produce la generación de un radical alcoxilo, el cual puede iniciar reacciones semejantes a las del radical hidroxilo. Se conoce que la cisteína, un aminoácido primordial en la síntesis de glutatión puede, en presencia de hierro, estimular la lipoperoxidación y por lo tanto agravar el daño a los tejidos (71). La cuantificación de hidroperóxidos es una medida directa de la lipoperoxidación, sin embargo, en la práctica son muy difíciles de determinar por ser muy inestables, por lo que se cuantifican de manera indirecta a través de productos secundarios o finales derivados de la transformación, descomposición o metabolismo de los hidroperóxidos. Una de estas pruebas es la medición del MDA por el ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Presión arterial

La presión sanguínea se regula a través de factores neurogénicos, hormonales, nutrimentales, bioquímicos y estructurales. Todos estos factores están integrados y la alteración de uno de ellos, frecuentemente repercute en los otros. La presión sanguínea en la población, sigue un patrón de distribución gaussiana, y la demarcación entre los niveles normales y anormales de la presión sanguínea es arbitraria.

La hipertensión es una elevación sostenida de la presión arterial general. El desarrollo de la hipertensión esencial, es decir aquella hipertensión que no tiene una causa definida, depende de la interrelación de factores genéticos y ambientales. Por otra parte, durante la vida de los individuos comunmente ocurren anomalías funcionales como obesidad, hipocalcemia e hipomagnesemia y anomalías estructurales como el desarrollo de placas ateroscleróticas en una arteria renal y el desarrollo de insuficiencia renal, que pueden complicar el perfil patogénico de la hipertensión.

La presión sanguínea depende del volumen sanguíneo y de la resistencia vascular periférica (RVP), esta última depende de la viscosidad de la sangre y, aún más importante, del calibre de los vasos de resistencia (primordialmente las arteriolas). El tono vascular se regula por el sistema nervioso simpático, hormonas circulantes y sustancias vasoactivas producidas por el endotelio vascular. Entre estos sistemas reguladores se encuentra la norepinefrina, el principal neurotransmisor del sistema nervioso simpático, y la angiotensina (Ang II). Además el endotelio es fuente de vasodilatadores como el óxido nítrico (ON) y las prostaciclina y de vasoconstrictores como la endotelina y tromboxano A₂, que en conjunto afectan el tono vascular (81). Una disfunción del tono vascular de las arterias que tienen un diámetro menor o igual a 200 μm contribuyen a incrementar la presión como un mecanismo primario y/o durante el desarrollo de la hipertensión porque mantienen alta la RVP. Por otra parte, la regulación del volumen circulante depende de la función renal. Sin embargo, la función renal y la retención de sodio puede ser afectada por los mismos factores neurogénicos, hormonales, nutrimentales, estructurales y bioquímicos responsables de la RVP, por lo que esta relación hace más difícil determinar la patogénesis de la hipertensión. Debido a esto, la causa de la elevación de la presión arterial se desconoce en la mayoría de los casos. Como consecuencia de ello, la hipertensión se trata de forma inespecífica, lo que produce un gran número de efectos colaterales menores.

Los metabolitos vasodilatadores que se producen de manera local en los tejidos activos incrementan el calibre de las arteriolas, y éste se regula de manera sistémica, por sustancias vasoactivas circulantes y por los nervios que inervan a las arteriolas. El endotelio juega un papel clave en la vasodilatación. Muchos estímulos actúan sobre las células endoteliales para producir el factor relajante derivado del endotelio (FRDE), una sustancia que se identificó como óxido nítrico (ON) (82,83), el cual es un potente vasodilatador.

Oxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un radical gaseoso, relativamente poco reactivo en comparación con otros radicales de importancia biológica como los radicales OH^\cdot y el anión O_2^\cdot . El ON puede dar lugar a otras especies químicas altamente reactivas como el ion nitroso (NO^+) y el radical nitroxilo (NO^\cdot), a través de mecanismos redox fisiológicos. Estas especies pueden reaccionar y modificar diversas moléculas biológicas (cuadro 3) (84).

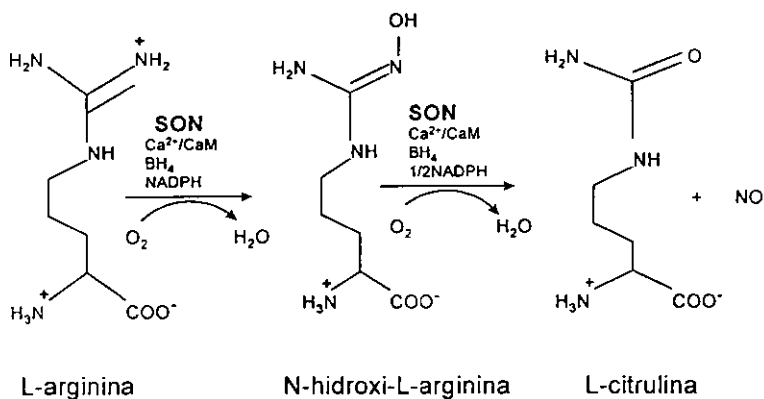
Cuadro 3. Interacciones bioquímicas del ON y de sus especies relacionadas (84)

Especies de ON	Reactantes	Productos
NO	metales de transición, O_2 , O_2^\cdot	Hemoglobina (Fe^{2+})-NO, NO_2^\cdot , ONOO $^\cdot$
NO^+	aminas, tioles aromáticos	nitrosaminas, proteína(cys)S-NO, Ar-NO
NO^\cdot	dimerización, tioles, metales	N_2O , R-S-NOH, RS-SR, hemoglobina (Fe^{3+})-NO
ONOOH, ONOO $^\cdot$	DNA, tioles, tirosina	bases diaminadas, R-S-OH, R-S-OOH, proteínas(tyr)-NO $_2$

El ON es altamente difusible debido a su bajo peso molecular, y teóricamente atraviesa cualquier tipo de membrana, aunque el factor limitante en su disponibilidad es su rápida interacción con el anión O_2^\cdot .

Lo cual genera el radical peroxinitrito (14). El ON inactiva diversas enzimas, una notable excepción es la guanilato ciclasa, la cual es activada por el ON. El ON regula el tono vascular del músculo liso, la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos, la transmisión sináptica y las acciones citostáticas/citotóxicas de los macrófagos (85).

El ON proviene del grupo guanidino de la L-arginina y se origina de una reacción dependiente de NADPH, catalizada por una familia de sintasas de óxido nítrico (SON) (86) (reacción 15). Por mol de ON formado se consume 1.5 mol de NADPH/H^+ , lo cual produce también 1.5 mol de NADP^+ y tres átomos de hidrógeno. En esta reacción hay una transferencia poco usual de 5 electrones. Debido a que los electrones son generalmente transferidos por pares desde el NADPH a las flavinas ($\text{NADPH}/\text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{FADH}_2 \rightarrow \text{FMNH}_2$), probablemente se requieran dos ciclos de catálisis para que la SON retorne a su estado basal (87). La transferencia de electrones por el grupo guanidino de la L-arginina y el papel preciso de cada uno de los cofactores no se conoce aún (88).



Reacción 15. Síntesis del óxido nítrico por la SON. CaM (complejo calcio calmodulina), BH₄ (tetrahidrobiopterina), NADPH (nicotinamida-adenin-dinucleótico fosfato)

Existen tres isomorfos de SON (cuadro 4), todas son productos de genes diferentes. La SON neuronal (tipo I) se encuentra en altas concentraciones en algunas células neuronales, en el sistema nervioso central y periférico, esta isoforma se activa por la calmodulina cuando existen concentraciones elevadas de Ca²⁺. La SON inducible (tipo II) se encontró principalmente en macrófagos, y no está presente en el resto de las células, pero puede ser inducida en hepatocitos y células del músculo liso por lipopolisacáridos y citocinas, su activación es independiente de los niveles intracelulares de Ca²⁺ (85). Su inducción es probablemente parte del mecanismo de la respuesta citotóxica. La SON endotelial (tipo III) es constitutiva y se asocia generalmente con la producción del FRDE. De manera semejante que la isoforma tipo I, esta enzima es regulada por las concentraciones intracelulares de Ca²⁺/calmodulina y a diferencia de las otras isomorfos se encuentra unida a membranas y se sugiere además que su regulación puede estar asociada a mecanismos de fosforilación (84,85). También se ha demostrado que los cambios en el pH intracelular pueden activar a la SON constitutiva endotelial (89). Las tres isomorfos tienen una estructura y función similar, utilizan la L-arginina, O₂ y NADPH como sustrato y requieren de FAD, FMN, calmodulina y tetrahidrobiopterina como cofactores (reacción 15). El mecanismo catalítico de la SON involucra el transporte de electrones mediado por flavinas del NADPH al hemo, y el oxígeno es incorporado al ON y a la citrulina.

Cuadro 4. Isomorfos de la SON (85)

Isomorfía	Peso del monómero	Localización cromosomal en humano	Número de exones	Localización en tejidos
SON neuronal	160 kDa; 1439 aa	12q24.21	29	neuronas, músculo esquelético, epitelio bronquial y traqueal
SON endotelial	133 kDa; 1203 aa	7q35	26	endotelio, miocitos y neuronas
SON inducible	135 kDa; 1153 aa	17q11.2	26 o 27	células vasculares y epiteliales renales, macrófagos alveolares, íleo, útero, plaquetas.

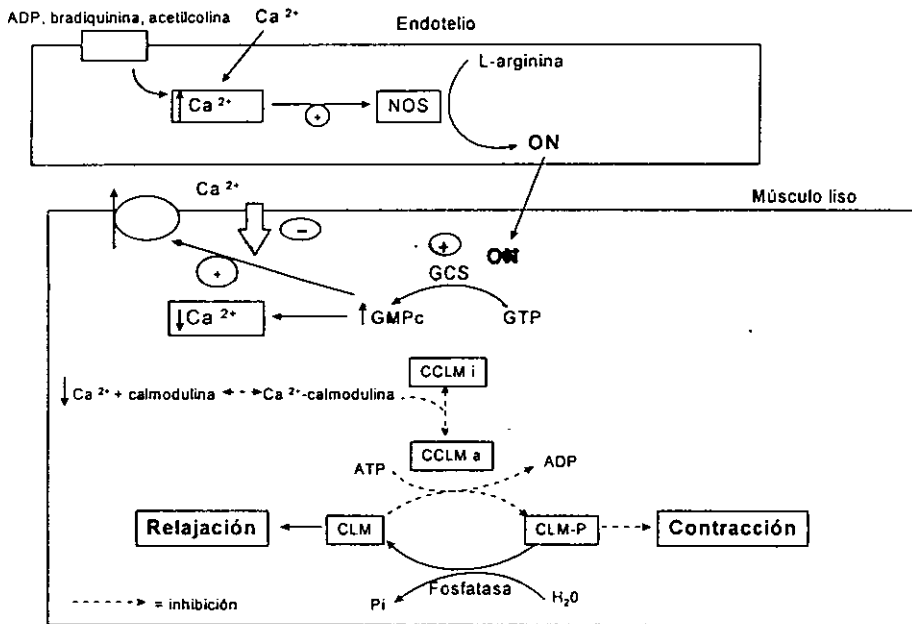
Las dos isomorfos constitutivas son responsables de la liberación basal y continua del ON. La formación del ON puede inhibirse por análogos de L-arginina como N ω -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) y por inhibidores relativamente selectivos como el 7-nitroindazole (inhibidor de la isomorfa neuronal) y la aminoguanidina (inhibidor de la isomorfa inducible) (85,90,91).

El ON ejerce un efecto vasodilatador en la microcirculación y su inhibición continua ocasiona un predominio de factores vasoconstrictores, originando una hipertensión arterial similar a la observada después de la infusión crónica de angiotensina II, norepinefrina o tromboxanos (90).

Efecto del óxido nítrico sobre la relajación vascular

La liberación de neurotransmisores y su efecto sobre las células endoteliales estimulan la síntesis de óxido nítrico. El ON se une al hierro del grupo hemo en el dominio catalítico de la guanilato ciclasa e incrementa su actividad lo que da lugar a la formación de GMPc. La consecuencia fisiológica del aumento del GMPc en las células endoteliales es desconocida, debido a que no se conoce que exista una proteína cinasa en ese sitio. En el músculo liso, el GMPc activa selectivamente a la cinasa dependiendo de GMPc (cGK) la cual esta presente en dos formas: la tipo I y la tipo II que son productos de un procesamiento alternativo del ARNm de la cGK. La tipo I es un homodímero de 78 kDa, tiene dos isomorfos, la I α y I β . Las células de músculo liso contienen niveles altos de cGK tipo I. Esta enzima fosforila y modula la actividad de las proteínas involucradas en la homeostasis del Ca²⁺ lo cual conduce a la disminución de los niveles de Ca²⁺ disponibles para la contracción. Sin embargo, como se discutirá más adelante, el mecanismo por el cual esta disminución ocurre no está aún bien definido (92,93). Por otra parte, el GMPc también induce una hiperpolarización en las células vasculares del músculo liso (89). Otras moléculas blanco del ON son las proteínas que contienen grupos SH. Los derivados del óxido nítrico como el ion NO⁺ interactúan con los grupos SH y producen nitrosoproteínas biológicamente activas. Las proteínas nitrosiladas, igual que el ON, son potentes vasodilatadores e inhibidores de la acción plaquetaria, estos efectos son mediados también vía activación de la guanilato ciclasa soluble. La vida media de estos compuestos es

significativamente más larga (30 min) que la del ON (aproximadamente 6 s) . Los compuestos que contienen ON pueden, por lo tanto, servir como aductos, los cuales estabilizan al ON prolongando su actividad y/o facilitando su acción biológica y extendiendo así, su campo de acción (89). La disminución del Ca^{2+} intracelular, en respuesta a la fosforilación de proteínas mediada por GMPc es, al menos, en parte, uno de los mecanismos responsables de la relajación del músculo liso (92). La contracción del músculo liso está controlada por el grado de fosforilación de la molécula de miosina en su cadena ligera LC2, ésta se fosforila por acción de una cinasa de cadena ligera estimulada por Ca^{2+} y se desfosforila por la fosfatasa C. La fosforilación de LC2 en el músculo liso provoca la contracción, y la defosforilación produce la relajación (esquema 4).

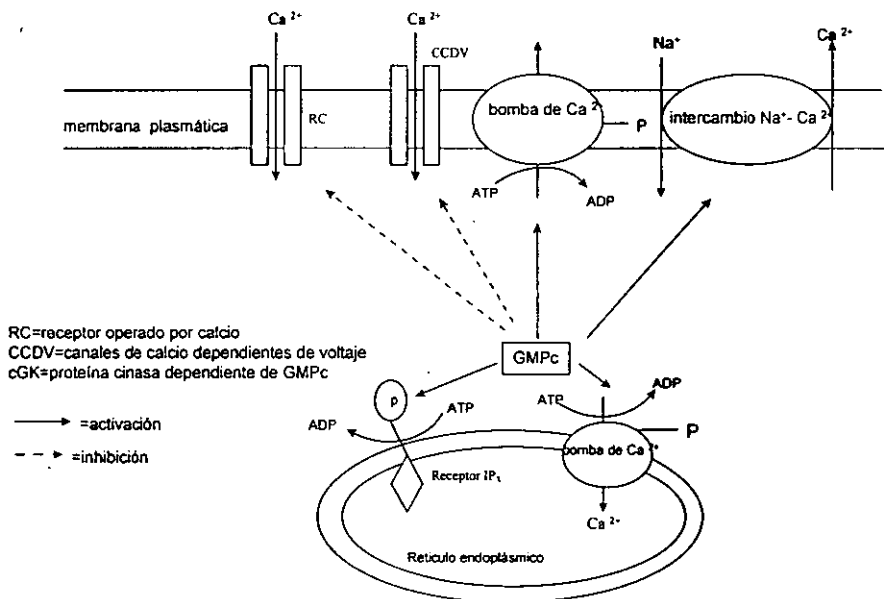


Esquema 4. Relajación del músculo liso por acción del ON. CCLMi (cinasa de la cadena ligera de miosina inactiva), CCLMa (cinasa de la cadena ligera de miosina activa), CLM (Cadena ligera de miosina desfosforilada), CLM-P (cadena ligera de miosina fosforilada) (88).

La relajación del músculo liso se puede llevar a cabo por la interferencia de cualquiera de los pasos que conduzcan a la fosforilación de la cadena ligera de la miosina. Uno de estos pasos en los que se propone que el GMPc interfiere, es en el incremento de Ca^{2+} intracelular, ya que éste se requiere

para la activación de la cadena ligera de la miosina. La activación de la cGK puede estar involucrada en la disminución de Ca^{2+} por la fosforilación y la activación de la ATPasa de Ca^{2+} . Cuando la concentración de Ca^{2+} disminuye hasta aproximadamente 10^{-7} M, a través de la acción de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática, la cinasa de la cadena ligera de miosina se desactiva y, por lo tanto, la cadena ligera de miosina se desfosforila por la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina y el músculo liso se relaja (84).

El aumento en la concentración de GMPc estimula, además, otros sistemas que disminuyen activamente los niveles de calcio dentro de la célula (Esquema 5). Entre los mecanismos propuestos están la activación de la bomba que cataliza la entrada de calcio al sarcolema, la activación del intercambio sodio/calcio y del cotransporte sodio/potasio/cloro (93). Probablemente el GMPc también puede inhibir la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares por un efecto inhibitorio en la formación de 1,4,5- inositol trifosfato por la cGK | lo que dá como resultado la reducción neta del Ca^{2+} intracelular (87,94,95). Sin embargo el papel del GMPc en el recambio del inositol fosfato no está totalmente claro. Por otra parte la cGK *in vitro* fosforila la subunidad alfa del canal K_{Ca} , la activación de este canal en el músculo liso conduce a la hiperpolarización y subsecuentemente a la inactivación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, causando una disminución del calcio intracelular (87).

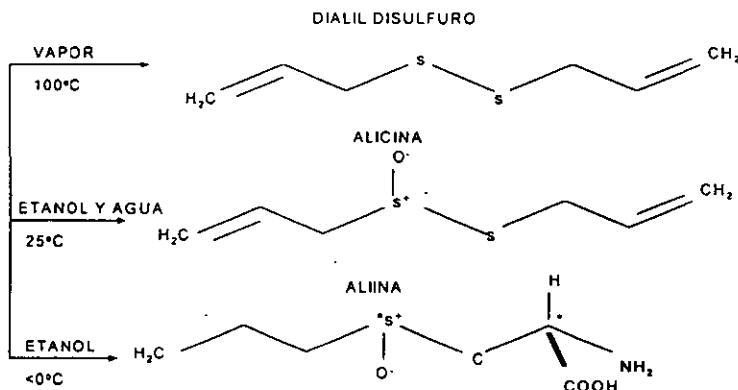


Esquema 5. Mecanismos propuestos para la disminución de Ca^{2+} intracelular a través de GMPc

El ajo: componentes, propiedades terapéuticas y efectos antioxidantes

Componentes

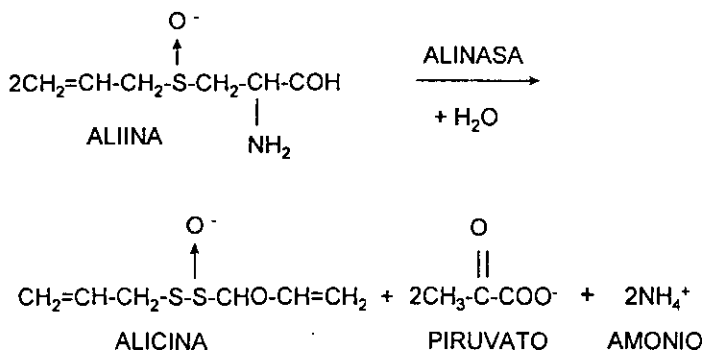
El ajo es miembro de la familia *Liliaceae*, su nombre científico es *Allium sativum* y se encuentra entre las plantas más cultivadas desde la antigüedad, es rico en compuestos azufrados y es uno de los vegetales que contiene niveles elevados de selenio (3.5 mg/g de peso fresco) (96). Los principales agentes activos del ajo son la alicina, el ajoene y el dialil disulfuro (compuestos sulfurados) pero también se han estudiado muchos otros (97). Estos compuestos pueden ser obtenidos dependiendo del tipo de extracción a la que se someta el ajo (Esquema 6).



Esquema 6. Compuestos sulfurados extraídos del ajo. El * indica centros quirales

La alicina (ácido dialiltiosulfínico u óxido de dialildisulfuro), es el principal constituyente odorífero característico del ajo, que está presente sólo en el ajo fresco y en polvo, no así en el aceite o macerado. Además de este compuesto, también están presentes el metilalil tiosulfinato y el alilmetiltiosulfinato, los cuales son liberados del bulbo del ajo fresco después de que su tejido es triturado o cortado (97). Dentro del bulbo de ajo, la aliina (inodora) es almacenada en las células mesofiliicas, las cuales no contienen la enzima alinasa. Ésta se encuentra compartamentalizada dentro de la célula y sólo cuando se le somete al ajo a un daño mecánico, la enzima entra en contacto con la aliina convirtiéndola en alicina, la cual es convertida en compuestos organosulfurados fuertemente olorosos (97) (Esquema 7). Al combinarse tres moléculas de alicina se producen dos moléculas de ajoene (97,98). El ajo es rico en compuestos azufrados: los sulfuros, disulfuros y trisulfuros han sido estudiados para determinar qué papel juegan en varias rutas metabólicas, en

particular en aquellas de detoxificación. La conjugación de agentes químicos tóxicos con glutatión y conjugados de cisteína es, al parecer, la principal defensa celular contra el daño tóxico (99).



Esquema 7. Formación de alicina a partir de aliina por acción de alinasa

Se piensa que la administración oral de ajo no presenta efectos tóxicos, sin embargo se han informado en la literatura casos de reacciones alérgicas al ajo o a otros miembros de la familia *Allium*, tales como dermatitis por contacto o asma (99).

En otro estudio, se comprobó la estabilidad térmica de los extractos de ajo, encontrándose que su actividad de atrapante de OH[·] sólo disminuyó un 10% cuando estos se sometieron a temperaturas de cocción (100), lo cual le confiere al ajo una mayor versatilidad en su uso.

Propiedades terapéuticas

En 1858, Louis Pasteur informó que el ajo tenía propiedades antibacterianas. Más tarde, Albert Schweitzer observó que era útil en el tratamiento contra disenteria amebiana, y también se informó que el jugo de ajo diluido 1:125,000 inhibía el desarrollo de ciertas bacterias (97). Por otra parte, posee también cualidades antitrombóticas y antivirales (101,102). Además reduce la síntesis de lípidos, probablemente a través de la oxidación de NADPH puede disminuir la movilización del glucógeno, lo cual conduce a su aumento en el hígado de las ratas, y su efecto hipoglucemiante se asocia al aumento en el nivel de insulina en suero (103,104). El dialil disulfuro, así como otros compuestos organosulfurados liposolubles, inhibe la proliferación de células tumorales humanas en cultivos celulares (105,106), y también disminuye los efectos carcinogénicos y hepatotóxicos de la 1,2-dimetilhidrazina (DMTH) inhibiendo probablemente la activación de este compuesto por el citocromo P450IIE1 (107). Se piensa que la acción observada en este modelo con DMTH es similar a la estudiada con tetracloruro de carbono y N-nitrosodimetilamina (108).

Efectos antihipertensores

Se ha descrito que el ajo (109) y algunos dipéptidos aislados y caracterizados en el extracto acuoso de ajo (110) inhiben a la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), la cual es una enzima muy importante en la regulación de la presión arterial originando el octapéptido angiotensina II, el cual es un vasoconstrictor muy potente. Por otra parte, los extractos etanólicos del ajo activan a la SÓN *in vitro*, una enzima que como se describió anteriormente, juega un papel muy relevante en el mantenimiento de la presión sanguínea (111-113)

Efectos antioxidantes

Las evidencias de los probables efectos antioxidantes del ajo se mencionan a continuación:

1. Los extractos etanólicos de ajo previenen la lipoperoxidación de biomembranas (microsomas hepáticos), inducida a través de radicales libres por el ácido ascórbico *in vitro* (114).
2. Los extractos de ajo envejecido, cuyos principales componentes son la S-alil-cisteína y S-alil-mercaptocisteína, inhiben la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico inducidas por el t-butil hidroperóxido en fracciones microsomas de hígado *in vitro* (115).
3. La alicina, al parecer posee características de atrapante de radicales hidroxilo (producto de la fotólisis del H₂O₂), ya que disminuye la cantidad de aductos del ácido 2,3- y 2,5-dihidroibenzoico y previene la lipoperoxidación en fracciones microsomas de hígado de manera dosis dependiente *in vitro* (116).
4. Los extractos acuosos de ajo reaccionan con radicales hidroxilo (producto de la reacción de Fenton), y así disminuyen la formación de complejos con la α -fenil-t-butil nitrona *in vitro* (117).
5. Los extractos acuosos de ajo también inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por Cu²⁺ *in vitro* (118).
6. Los compuestos organosulfurados del extracto envejecido de ajo en un modelo *in vitro*, son eficaces para atrapar H₂O₂ e inhibir lipoperoxidación (119).
7. Los extractos de ajo previenen la lipoperoxidación de homogenados de hígado de conejo, inducida por radicales OH[•] de una manera dosis dependiente *in vitro* (100).
8. El dialil disulfuro, en una dosis de 1 mM, incrementa el contenido de GSH en hepatocitos primarios de rata *in vitro* (120).
9. En las células del endotelio vascular tratadas con extractos de ajo envejecido, disminuye la liberación de especies reactivas de oxígeno, en particular de H₂O₂ de manera dosis dependiente, en condiciones normales y cuando son expuestas a estrés oxidativo a través de un sistema generador de aniones superóxido. Los niveles de la enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSH-Px, aumentan en las células que son tratadas con el extracto de ajo, lo cual puede explicar la disminución de H₂O₂ en estos cultivos (121).

10. En las células del endotelio vascular tratadas con extractos de ajo envejecido, existe un incremento dosis y tiempo dependiente de las actividades de SOD y glutatión reductasa, así como de los niveles de glutatión reducido lo que sugiere que este extracto puede modular elementos enzimáticos y no enzimáticos del ciclo redox-GSH, además de la actividad de SOD (122).
11. La administración de ajo envejecido atenúa el daño por isquemia cerebral en ratas (123).
12. El efecto cardioprotector del ajo en las membranas miocárdicas, puede deberse a su capacidad de atrapar de radicales libres y a su naturaleza lipofílica (109).
13. El sulfóxido de S-alil-cisteína disminuye los niveles de malondialdehído e incrementa las actividades de las enzimas CAT y SOD en el hígado de ratas diabéticas (98).
14. Los extractos acuosos de ajo tienen un efecto radioprotector en el daño cromosómico inducido por radiaciones gamma en ratones (124).

Otro aspecto muy interesante del ajo, además de sus propiedades antioxidantes, es la posibilidad de que algunos de sus principios activos puedan modular algunas actividades celulares, a través de la activación de la transcripción génica. Pan *et al.* (125,126) observaron que el dialil disulfuro y, más concretamente, uno de sus metabolitos, el dialil sulfona, puede activar la transcripción del gen del citocromo P450 2B1/2, lo que abre la posibilidad de que algunos de los efectos del ajo puedan deberse no únicamente a su acción directa sobre los metabolitos implicados en las patologías, sino que sea capaz de modular la respuesta celular hacia estos a través de la regulación de los genes.

II. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Dadas las propiedades antioxidantes e hipolipemiantes del ajo, su bajo costo y extendido uso, se hace muy atractivo estudiar sus posibles efectos terapéuticos en el daño renal mediado por ERO. Además de las características del ajo ya mencionadas, la preservación de sus propiedades antioxidantes durante el calentamiento (100) le confiere otra enorme ventaja en su uso como agente terapéutico natural. Por lo tanto, en este estudio se plantea investigar el efecto de una alimentación suplementada con ajo en polvo sobre las siguientes variables en ratas con SN inducido con ANP: (a) proteinuria y colesterolemia, b) actividades de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GSH-Px, y (c) estrés oxidativo medido como cantidad de H_2O_2 *in vivo* y los niveles de lipoperoxidación. De esta manera conoceremos si el ajo en polvo tiene un efecto protector y si este se asocia a su actividad antioxidante intrínseca o bien al aumento de las defensas antioxidantes enzimáticas.

Además, dada la controversia que existe en cuanto a la participación *in vivo* del H_2O_2 en la fisiopatología del SN inducido por ANP se justifica hacer estudios adicionales para precisar este punto. En este trabajo se exploró la participación del H_2O_2 mediante la inhibición *in vivo* de la enzima CAT.

Por otra parte, también se han descrito otras propiedades del ajo como la activación de la sintasa de óxido nítrico (111-113), enzima importante en la regulación de la presión arterial, lo que justifica ampliamente estudiar el efecto de la alimentación con ajo en polvo sobre la hipertensión inducida por N ω -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico.

En este proyecto se usó polvo de ajo (completo) dado que es una de las formas en las que se consume y a que no se quiso eliminar *a priori* ningún componente del mismo que pueda tener propiedades benéficas.

III. OBJETIVOS

Objetivos generales

- I. Investigar si una dieta suplementada con ajo en polvo tiene un efecto protector en el SN inducido por ANP en ratas.
- II. Investigar la participación del H_2O_2 en el SN inducido por ANP.
- III. Investigar si una dieta suplementada con ajo en polvo tiene un efecto sobre la hipertensión inducida por N- ω -nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME).

Objetivos particulares

I. Modelo de SN inducido por ANP

1. Evaluar si una dieta suplementada con ajo en polvo presenta un efecto protector sobre el daño renal y la hipercolesterolemia midiendo: a) proteínas en suero y orina, b) albúmina en suero, c) colesterol en suero d) función renal como depuración de creatinina y nitrógeno de urea.
2. Evaluar si el ajo en polvo disminuye la lipoperoxidación renal y si esto se asocia con una menor magnitud del daño evaluado como proteinuria.
3. Evaluar si el ajo en polvo modifica la cantidad de H_2O_2 *in vivo* en ratas normales y en ratas inyectadas con ANP.
4. Evaluar si el ajo en polvo modifica las defensas antioxidantes de la rata midiendo en riñón las actividades de las enzimas CAT, SOD y GSH-Px, así como la actividad plasmática de GSH-Px.
5. Evaluar si la inhibición *in vivo* de la CAT exacerba el daño por ANP midiendo: a) proteínas en plasma y orina, b) albúmina y colesterol en plasma, y c) función renal como depuración de creatinina y nitrógeno de urea.
6. Evaluar si la inhibición *in vivo* de la CAT modifica las actividades renales de CAT, GSH-Px y SOD, así como las actividades plasmáticas de GSH-Px.

III Modelo de hipertensión

1. Evaluar si el ajo en polvo presenta algún efecto sobre la presión sistólica y la excreción urinaria de nitritos en el modelo experimental de hipertensión.

IV. HIPOTESIS

Se espera que la alimentación con una dieta enriquecida con ajo en polvo prevenga o aminore la nefrotoxicidad en el modelo experimental de SN inducido por ANP en ratas y que esto correlacione con una disminución en los distintos marcadores de daño oxidativo por ERO.

Es posible también que el ajo en polvo aumente las defensas antioxidantes de la rata, aumentado las actividades renales de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GSH-Px, así como las actividades plasmáticas de GSH-Px.

Si la cantidad de H_2O_2 aumenta *in vivo* durante el daño renal en el SN inducido por ANP, la inhibición *in vivo* de CAT debiera exacerbar el daño y la disfunción renal.

Se espera que una dieta suplementada con ajo en polvo disminuya la hipertensión producida por el N ω -nitro-L-arginina-metil-ester, un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico.

V. MATERIALES Y METODOS

1 MATERIALES

1.1 Reactivos

El ANP, el ácido tiobarbitúrico, el NADPH, el glutatión reducido, la glutatión reductasa, la xantina oxidasa, la xantina, el citocromo C, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el 3 amino-1,2,4 triazole (ATZ), la SOD de eritrocitos de bovino, el verde de bromocresol para la determinación de albúmina y el tritón X100 se compraron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., EUA). El H_2O_2 al 30% fue de Mallinckrodt Chemicals Co. (Paris, Kentucky). Las sales de fosfatos para las soluciones amortiguadoras, el ácido acético, el n-butanol, la piridina, el etanol, el ácido tricloroacético, el EDTA, el hidróxido de sodio, el carbonato de sodio, el cloruro cúprico, el tartrato de sodio y de potasio, el sulfato cúprico, así como el sulfato de amonio se compraron a J.T.Baker. Para las determinaciones de colesterol, creatinina, nitrógeno de urea se utilizaron estuches comerciales de Lakeside (Boehringer, Mannheim).

1.2 Dietas

Las dietas suplementadas con ajo en polvo se prepararon de la siguiente manera: los nutricubos comerciales para roedores (Purina, México D.F.) se pulverizaron y a una porción de este alimento se agregó ajo en polvo (Mc Cormick, México D.F.) a una concentración final de 2 y 3%. La concentración de ajo en polvo al 2% se escogió debido a que se había informado un efecto cardioprotector en el daño por isquemia-reperfusión (109). A otra porción no se le agregó ajo en polvo y sirvió como dieta control. Ambas dietas se repetizaron nuevamente y con éstas se alimentó a las ratas. La única diferencia entre ambas dietas fue la presencia de ajo en polvo. Nosotros esperamos que este proceso no haya modificado la composición del ajo en polvo, debido a que no analizamos la composición química del polvo de ajo, ni la dieta suplementada con este polvo.

1.3 Animales

Se usaron ratas macho Wistar de entre 150 y 200 g de peso de los bioterios de la Facultad de Química UNAM y del INNSZ.

2 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. Efecto del ajo en polvo sobre la nefrotoxicidad por aminonucleósido de puromicina

Cada experimento constó de 4 grupos: control (CT), control alimentado con ajo en polvo (AJO), nefrótico (SN) y nefrótico alimentado con ajo en polvo (SNA). El número de ratas fue de 5 por grupo en cada experimento. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas para la determinación del consumo de alimento y recolección de orina de 24 h y se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz y 12 h oscuridad con libre acceso al alimento y al agua. La recolección de orina se realizó cada dos días y el sacrificio se llevó a cabo 10 días después de la inyección del ANP. Se llevaron a cabo 4 experimentos para valorar el efecto del ajo en polvo sobre la nefrotoxicidad del ANP. En todos los casos, el ANP y el vehículo se inyectaron subcutáneamente.

1°. Ratas alimentadas con una dieta con ajo en polvo al 3% dos semanas previas a la inducción del SN. El ANP (15 mg/Kg de peso) se inyectó durante 5 días, las ratas se sacrificaron el día 10. Cepa Wistar, Facultad de Química, UNAM

2°. Ratas alimentadas con una dieta con ajo en polvo al 2% 4 semanas antes de la inducción de SN. Los animales recibieron una sola dosis de ANP (50 mg/Kg de peso). Cepa Wistar, Facultad de Química, UNAM.

3°. Ratas alimentadas con una dieta con ajo en polvo al 2% un día antes de la inyección con ANP (75 mg/Kg de peso). Las ratas se sacrificaron el día 10. Cepa Wistar, Facultad de Química, UNAM.

4°. Ratas alimentadas con una dieta con ajo en polvo al 2% dos semanas antes de la inducción de SN. Los animales recibieron una sola dosis de ANP (75 mg/Kg de peso). Las ratas se sacrificaron el día 10. Cepa Wistar del INNSZ.

Se midieron las proteínas urinarias cada dos días hasta el día del sacrificio. Asimismo en el día del sacrificio se midieron las proteínas totales en suero y homogeneizado de riñón, se midió en suero albúmina, colesterol, creatinina y nitrógeno de urea en suero y en orina creatinina. Se extrajeron los riñones para determinación de lipoperoxidación y de las actividades de CAT, SOD y GSH-Px. Se determinaron las actividades plasmáticas de GSH-Px y SOD sólo en los grupos experimentales 3 y 4. En grupos adicionales de ratas se determinó la cantidad renal de H_2O_2 *in vivo* como una forma más de evaluar estrés oxidativo en ratas alimentadas con una dieta con ajo en polvo y/o inyectadas con ANP:

1o. Las ratas se alimentaron con una dieta estándar y con una dieta con ajo en polvo al 2% durante dos semanas, alcanzando un peso de 150-200 g. Al cabo de este tiempo se les midió la cantidad renal de H_2O_2 *in vivo* usando ATZ. A estos animales se les extrajo el riñón para la determinación de la actividad de CAT.

2o. Las ratas se alimentaron con una dieta estándar y con una dieta con ajo en polvo al 2% durante dos semanas, se les indujo el SN con una sola dosis de ANP (75 mg/Kg) y 10 días después se les midió la cantidad renal de H_2O_2 *in vivo* usando ATZ.

2.2 Efecto de la inhibición *in vivo* de la CAT por 3-amino-1,2,4 triazole (ATZ) sobre el SN experimental

Previo a este experimento, se realizó una curva temporal de la recuperación de la actividad de CAT en animales inyectados con ATZ (1 g/Kg de peso) 3, 24, 48 y 96 h después de su administración. Los riñones e hígado se homogeneizaron para medir la actividad de CAT y concentración de ATZ.

Para evaluar el efecto de la inhibición de la CAT en el SN experimental, los animales se dividieron en cuatro grupos: 1. grupo CT, inyectado con solución salina; 2. grupo ANP, inyectado con ANP (75 mg/Kg); 3. grupo ATZ, inyectado con ATZ (1 g/Kg); 4. grupo ATZANP inyectado con ATZ (1 g/Kg) y 24 horas después se inyectó el ANP (75 mg/Kg). Se recolectó orina de 24 h cada 2 días y se sacrificaron el día 10. Se determinaron proteínas séricas y urinarias, albúmina sérica, colesterol sérico, nitrógeno de urea sérico, creatinina sérica, depuración de creatinina, así como actividades renales de CAT, SOD total y GSH-Px y GSH-Px plasmática.

Con los datos generados de esta parte del trabajo, se redactó un manuscrito que está en prensa en la revista *Free Radical Biology & Medicine*. En esta tesis se anexa una copia del mismo.

2.3 Efecto del ajo en polvo sobre la hipertensión inducida por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico

Modelo de hipertensión por N ω -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME)

Se alimentaron durante 8 semanas dos grupos de ratas con una dieta control y una dieta con ajo en polvo al 2%. Después de las primeras cuatro semanas se les administró en el agua de beber a ambos grupos L-NAME (50 mg/L). En cada una de las cuatro semanas posteriores se les midió la presión basal sistólica y la excreción urinaria de nitritos. En un grupo adicional de animales se estudió si la hipertensión inducida por L-NAME revertía al cambiarle la dieta con ajo en polvo.

Los detalles metodológicos y los resultados están en el artículo anexo a esta tesis.

Pedraza-Chaverrí J, Tapia E, Medina Campos O-N, Granados MA, Franco M. Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sciences* 1998; 62 (6); PL 71-77.

3 DETERMINACIONES ANALITICAS

3.1 Determinaciones bioquímicas

Las proteínas totales en suero, orina y homogeneizado se determinaron por el método de Lowry *et al.* (127). El colesterol, el nitrógeno de urea y creatinina en suero y orina se determinaron espectrofotométricamente utilizando estuches comerciales (50).

El colesterol se determinó por el método CHOD-PAP. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesteroleserasa en colesterol y ácidos orgánicos, este colesterol es oxidado por la colesteroxidasa a Δ^4 colesteno y este último compuesto en una reacción catalizada por la peroxidasa en presencia de 4-aminofenazona y fenol, produce un complejo colorido de 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona, la cual absorbe a 546 nm, la absorbancia de este compuesto es directamente proporcional al colesterol presente en la muestra.

La creatinina se determinó a través de la reacción de Jaffé. En esta reacción, la creatinina forma un complejo colorido con picrato en medio alcalino. El producto formado absorbe a 520 nm y su absorbancia es directamente proporcional a la concentración de creatinina, presente en la muestra.

La determinación de albúmina se llevó a cabo, a través de la reacción de la albúmina con el verde de bromocresol. La albúmina se une al verde de bromocresol para producir un complejo colorido que tiene una absorbancia máxima a 628 nm. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de la albúmina presente en la muestra.

La concentración de urea se realizó por el método cinético UV. La urea presente en la muestra se hidroliza por la ureasa a amonio y CO_2 . En una reacción acoplada, el α -cetoglutarato y el NADH presentes en la misma mezcla de reacción, reaccionan utilizando el amonio producido por la ureasa, convirtiendo el α -cetoglutarato a L-glutamato por la glutamato deshidrogenasa. El consumo de NADH disminuye la absorbancia a 340 nm y esta disminución es directamente proporcional a la cantidad de urea presente en la muestra.

3.2 Preparación del homogeneizado renal para determinación de lipoperoxidación (Lpx), actividad de las enzimas CAT, SOD y GSH-Px así como para la determinación de ATZ.

Un riñón se lavó con solución salina isotónica y se homogeneizó en un politrón a velocidad máxima, durante 10 segundos en 9.5 ml (61) de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 con Tritón X-100 al 1% (36). El homogeneizado se filtró a través de una capa de gasas, una parte se utilizó para determinar lipoperoxidación y proteínas, y la otra se centrifugó a 16,900 g x 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -40°C y en éste ensayaron posteriormente las actividades de las enzimas antioxidantes.

3.3 Lipoperoxidación en riñón

Para determinar el índice de lipoperoxidación se cuantificaron los niveles de malondialdehído midiendo las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) empleando el método de Ohkawa *et al.* (128) con algunas modificaciones (61).

Se incubaron 100 μ l del filtrado a 95°C en un baño de aceite durante 1 hora con la siguiente mezcla de reacción: 0.2 ml de dodecil sulfato de sodio al 8.1%, 1.5 ml de ácido acético al 20% pH 3.5, 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y 0.7 ml de agua destilada. Al término de la incubación los tubos se enfriaron y a cada uno se les agregó 1 ml de agua destilada y 5 ml de una mezcla de n-butanol:piridina (15:1 vol/vol). La mezcla se agitó y se centrifugó durante 15 minutos a 2,000 g. Se determinó espectrofotométricamente la absorbencia de la capa orgánica a 532 nm. Los resultados se obtuvieron interpolando la absorbencia de las muestras problemas en una curva patrón utilizando al 1,1,3,3-tetrametoxipropano como estándar.

La lipoperoxidación se expresó como nmoles de MDA/mg de proteína.

3.4 Determinaciones enzimáticas

3.4.1 Actividad de la GSH-Px en riñón y en plasma

Se empleó el método de Lawrence y Burk (129). El sobrenadante del homogeneizado renal se diluyó 1:10 y el plasma 1: 5. Ambas diluciones se hicieron con el amortiguador de fosfatos y 100 μ l de esta dilución se mezclaron con 800 μ l de la siguiente solución: fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 unidad de glutatión reductasa/ml y 1 mM glutatión reducido. Se preparó un blanco con la mezcla de reacción añadiendo agua destilada en lugar de la muestra. Después de 5 min de incubación de la muestra con el amortiguador a temperatura ambiente, se agregaron 0.1 ml de H₂O₂ 0.25 mM a cada muestra e inmediatamente se leyó la absorbencia a 340 nm cada min durante 3 min.

La actividad de la GSH-Px se determinó promediando los cambios de absorbencia por min y multiplicando este promedio por 1.6. Este factor se obtuvo tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm es de 6.22×10^3

$$\Delta \text{Abs} = \epsilon \varnothing [\text{NADPH}]$$

donde ΔAbs es igual al cambio de absorbencia por min; ϵ es el coeficiente de absorción milimolar y \varnothing es la distancia del paso de luz de la celda.

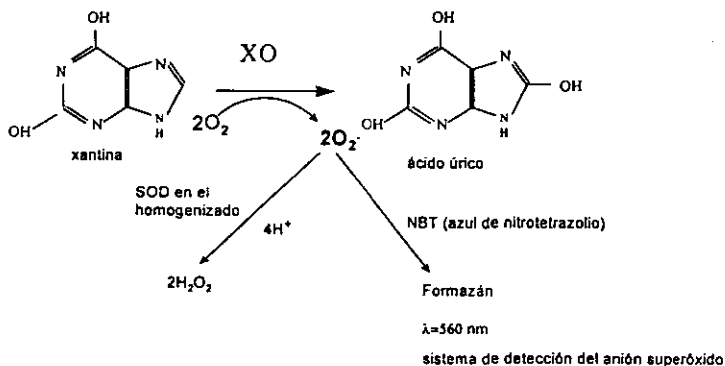
Finalmente se dividió este resultado entre los mg de proteína. Los datos se expresaron como μ moles de NADPH oxidado/min/mg de prot.

3.4.2 Actividad de SOD total en riñón

3.4.2.1 Método de reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) (130)

Se utilizó una mezcla de reacción que contiene 40 ml de xantina 0.3 mM, 20 ml de EDTA 0.6 mM, 20 ml de NBT 10 μ M, 6 ml de albúmina sérica bovina 0.1%, 12 ml de carbonato de sodio 400 mM. Se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración final de 167 U/L. En tubos de ensayo se colocaron 2.45 ml de la mezcla de reacción y se mantuvieron a una temperatura de 25° C, se adicionaron 0.5 ml del homogeneizado diluido 1:100, inmediatamente después se le agregó 50 μ L de la solución de xantina oxidasa con intervalo de 30 seg. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero sin la solución de xantina oxidasa, se incubó 30 min, y al final adicinando 1 ml de una solución 0.8 mM de cloruro cúprico para parar la reacción. Se leyó la densidad óptica a 560 nm. De manera paralela, se preparó un blanco de comparación el cual no llevaba homogeneizado pero sí xantina oxidasa. Una unidad de SOD se define como aquella que inhiba en un 50% la reducción del NBT (Esquema 8).

Los resultados se expresan como unidades/mg de prot. Para verificar la validez de nuestro ensayo se realizó una curva de inhibición con la enzima pura de Cu,Zn-SOD de eritrocitos de bovino.



Esquema 8. Reacciones para determinación de SOD a través de la inhibición de la reducción del nitroazul de tetrazolio

3.4.3 Actividad renal de CAT

Se determinó usando el método de Aebi (36). En una celdilla de cuarzo de 1.6 ml se adicionaron 25 μ l del homogeneizado diluido 1:30 a 725 μ l de H_2O_2 7.7 mM en un amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.0. Se midió el cambio de absorbencia a 240 nm de 0 a 15 seg que es el período en que la descomposición del H_2O_2 sigue una cinética de primer orden (36).

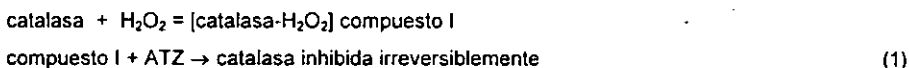
De acuerdo a Aebi (36), se usa la constante de reacción de primer orden (κ) como la unidad de actividad de la CAT, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\kappa = (1/\Delta t)(2.3 \times \log [A_1]/[A_2])$$

donde Δt = intervalo de tiempo medido, $[A_1]$ y $[A_2]$ son las absorbencias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresaron como κ /mg de prot.

3.5 Determinación de la cantidad renal de H_2O_2 *in vivo*

El método empleado para detectar H_2O_2 *in vivo* está basado en la inhibición de CAT por ATZ y está ampliamente validado (131). Se sabe que la CAT es inactivada por ATZ únicamente en presencia de H_2O_2 dado que el ATZ reacciona con el compuesto intermediario I, formando un complejo covalente inactivo con la proteína (reacción 1). La inactivación de la CAT *in vivo* puede, por lo tanto, ser interpretada como una medida de la cantidad de H_2O_2 presente en el tejido. (132-134).



La inactivación de la CAT se puede prevenir por el etanol, ya que éste reduce rápidamente el compuesto I y compete con el ATZ en la reacción (reacción 2) (135).



El grupo de ratas a estudiar se dividió en 2 partes iguales. Al primer subgrupo se les inyectó intraperitonealmente etanol (1:1) en solución salina (2 g/Kg) 15 min antes de la inyección de ATZ, y al segundo subgrupo de animales se les inyectó el mismo volumen de solución salina. A todas las ratas se les inyectó intraperitonealmente con una solución de ATZ al 5% en solución salina (0.1 g/Kg) y se sacrificaron 60 min después de la inyección con ATZ. Se extrajeron los riñones y se prepararon para medir la actividad de CAT. La diferencia de la actividad de CAT, medida con o sin etanol, representa la cantidad del compuesto I inactivo irreversiblemente por el ATZ y directamente relacionado con la formación *in vivo* de H_2O_2 .

3.6 Determinación de ATZ

La concentración de ATZ en los homogeneizados de tejido y en orina se determinó por un método espectrofotométrico con el ácido 2,7 disulfónico 4,5-dihidroxi-naftaleno (ácido cromotrópico) a través de una reacción de diazotación lo cual genera un complejo colorido que se lee a 525 nm (136).

El homogeneizado se mezcla con un volumen igual de ácido tricloroacético (ATC) al 10% y se centrifuga a 2,700xg durante 10 min. El sobrenadante diluido 1:5 con ATC al 5% se utiliza para el análisis. Se colocan en un tubo 2 ml de ésta última dilución y se le adiciona 0.4 ml de nitrato de sodio 0.01 M y 0.4 ml de ácido cromotrópico 0.0025 M (recién preparado). Se mezclan y el tubo se coloca en un baño de agua hirviendo durante 2.5 min al término de los cuales se enfría, de preferencia en un baño de agua fría. La lectura se realiza contra un blanco que se prepara con ATC al 5%, siguiendo el mismo procedimiento. Las lecturas se interpolan en una curva patrón utilizando ATZ como estándar.

4 ANALISIS ESTADISTICO

El estudio estadísticos se llevo a cabo, utilizando un análisis de varianza y comparaciones múltiples por el método de Bonferroni, en el caso de las concentraciones de ATZ en hígado y riñón, las comparaciones múltiples se hicieron por el método de Dunnett. Se utilizaron pruebas de T no pareadas para comparar la cantidad de H_2O_2 *in vivo* en ratas control. Todos los análisis se hicieron con el programa Graph Pad. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

VI RESULTADOS

1 Efecto del ajo en polvo sobre la nefrotoxicidad inducida por ANP

1.1 Dieta con ajo en polvo al 3% por 2 semanas previas a la inducción de SN con una dosis de ANP (15 mg/Kg) durante 5 días

Proteinuria

En la Fig. 1 se muestra el curso temporal de la proteinuria desarrollada por el grupo de ratas tratadas con ANP (SN) y las alimentadas con ajo en polvo al 3% más ANP (SNA), con sus respectivos controles, CT (alimento normal), CTA (alimento con ajo en polvo). El pico máximo se alcanzó el día 8 (SN 471±64 vs CT 15±4; SNA 469±39 vs CTA 12±4 mg/24 h), $p < 0.001$. La proteinuria no fue diferente entre los dos grupos nefróticos.

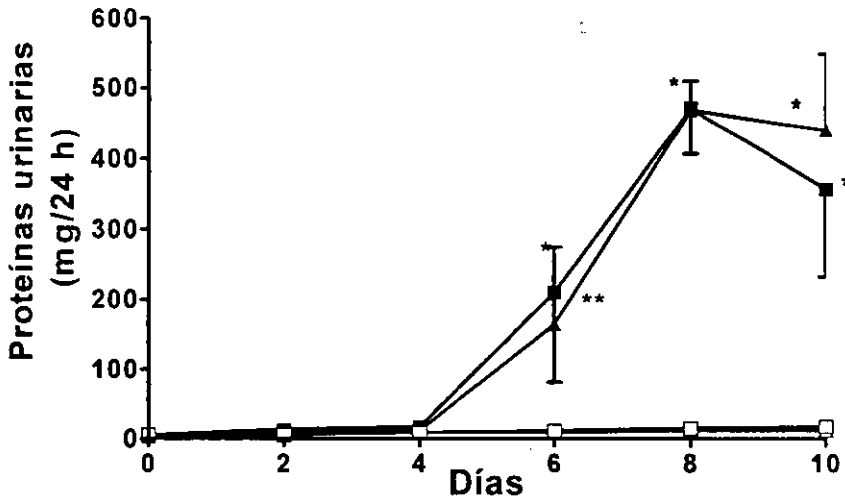


Figura 1. Proteínas urinarias de ratas alimentadas con dieta estándar y dieta con polvo de ajo al 3%. □ CT △ AJO ■ SN ▲ SNA
* $P < 0.001$ VS CT Y VS CTA; ** $P < 0.05$ VS CTA, $n = 5$

Determinaciones bioquímicas en el día 10 (Tabla 1)

La albúmina sérica disminuyó y el colesterol sérico aumentó en los grupos nefróticos ($p < 0.001$). La disminución de los niveles séricos de proteínas totales no fue significativo; la función renal evaluada como nitrógeno ureico, creatinina sérica y depuración de creatinina no cambió. Finalmente, la lipoperoxidación renal no cambió significativamente en los grupos nefróticos.

Tabla 1. Efecto de la alimentación con ajo en polvo al 3% sobre los parámetros bioquímicos en suero, depuración de creatinina y lipoperoxidación renal (Lpx) en ratas control y nefróticas.

Grupo	Proteínas g/dl	Albúmina g/dl	Colesterol mg/dl	Nitrógeno ureico mg/dl	Creatinina mg/dl	Depuración de creatinina ml/min	Lpx nmol MDA/mg prot
CT	5.7±1.2	3.5±0.2	65±4	27±4	0.7±0.04	0.84±0.2	0.22±0.06
CTA	6.2±0.5	4.2±0.4	70±6	23±3	0.7±0.06	0.84±0.01	0.22±0.03
SN	4.8±0.4	1.5±0.04*	201±40*	42±10	1.1±0.18	0.53 ±0.23	0.11±0.03
SNA	4.6±0.4	1.9±0.3**	169±29**	39±5	0.8±0.13	0.60±0.03	0.12 ±0.01

CT: ratas control con dieta normal. SN: ratas con dieta normal más ANP. CTA: ratas control con dieta suplementada con ajo en polvo al 3%. SNA: ratas con dieta suplementada con ajo en polvo al 3% más ANP. * $p < 0.001$ vs CT y ** $p < 0.001$ vs CTA. $n=5$.

1.2 Dieta con ajo en polvo al 2% por 4 semanas y una dosis de ANP (50 mg/Kg)

En este experimento, el curso de la proteinuria se siguió hasta el día 8, (SN 224±75 vs CT 5±4; SNA 309 ±49 vs CTA 4±2). Ya que no hubo efecto protector del ajo en polvo sobre la proteinuria, las ratas no se sacrificaron.

1.3 Dieta con ajo en polvo al 2% por 1 día y una dosis de ANP (75 mg/Kg)

Proteinuria

En la Fig. 2 se muestra el curso temporal de la proteinuria desarrollada por las ratas tratadas con ANP. En este caso, el grupo con la dieta suplementada tiene un pico máximo de proteinuria el día 8 (SNA 548±82 vs CT 9.1±6.0 mg/24 h, $p < 0.001$), mientras que el grupo con dieta normal en el día 10 tiene una mayor excreción de proteínas (453±111 mg/24 h) que en el día 8 (432±105 mg/24 h). Todos los animales se sacrificaron el décimo día.

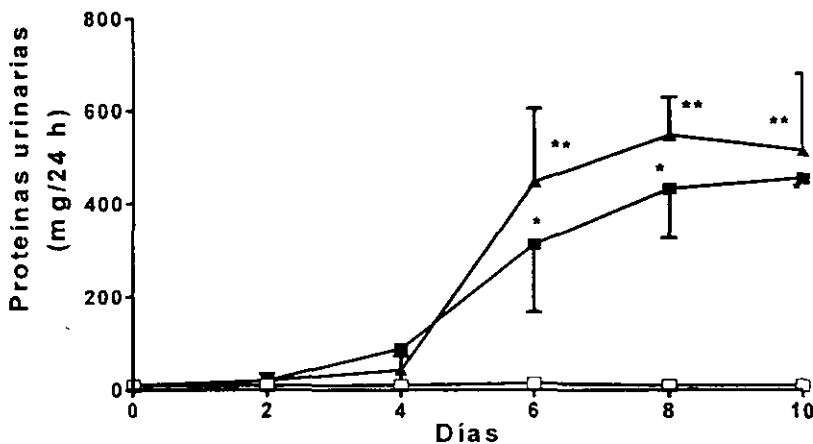


Figura 2. Proteínas urinarias de ratas alimentadas con dieta estándar y dieta con ajo en polvo al 2% un día antes de la administración de ANP. □ CT △ AJO ■ SN ▲ SNA n=5, *p<0.001 vs CT; **p<0.001 vs CTA

Determinaciones bioquímicas y lipoperoxidación renal (Tabla 2)

Las proteínas totales y la albúmina en suero disminuyeron, y el colesterol sérico aumentó en los grupos nefróticos. En los parámetros que nos permiten evaluar la función renal como lo son la creatinina sérica, depuración de creatinina y nitrógeno ureico en suero, no hay diferencias entre los grupos nefróticos y controles. No hubo ninguna diferencia en los niveles de lipoperoxidación renal entre los cuatro grupos de ratas estudiadas en el día 10.

Tabla 2. Efecto de la alimentación con ajo en polvo al 2% un día antes de la inducción de SN, en los parámetros bioquímicos en suero, depuración de creatinina y lipoperoxidación renal (lpx) en ratas control y nefróticas.

Grupo	Proteínas g/dl	Albúmina g/dl	Colesterol mg/dl	Nitrógeno ureico mg/dl	Creatinina mg/dl	Depuración de creatinina ml/min	Lpx nmol MDA/mg prot.
CT	6.4±0.12	3.4±0.20	45±6	16±3	0.4±0.04	1.1±0.1	0.17±0.02
CTA	6.6±0.13	3.4±0.18	53±3	13±2	0.4±0.06	1.1±0.2	0.15±0.03
SN	5.1±0.50 *	1.4±0.26 *	269±39 *	18±5	0.7±0.2	1.2±0.4	0.10±0.03
SNA	5.1±0.40 **	1.2±0.27 **	296±48 **	15±5	0.8±0.3	1.2±0.4	0.11±0.06

* p<0.001 vs CT; ** p< 0.001 vs CTA, n=5. Para más detalles ver tabla 1.

1.4 Dieta con ajo en polvo al 2% 2 semanas y una dosis de ANP (75 mg/K g de peso)

Proteinuria

En la Fig. 3 se muestra el curso temporal de la proteinuria desarrollada por el grupo de ratas tratadas con ANP y las alimentadas con ajo en polvo al 2% más ANP con sus respectivos controles. El pico máximo de proteinuria se alcanzó el día 8 posterior a la inyección de la droga en ambos grupos, (SN 729±51; SNA 655±158 mg/24 h, p= NS).

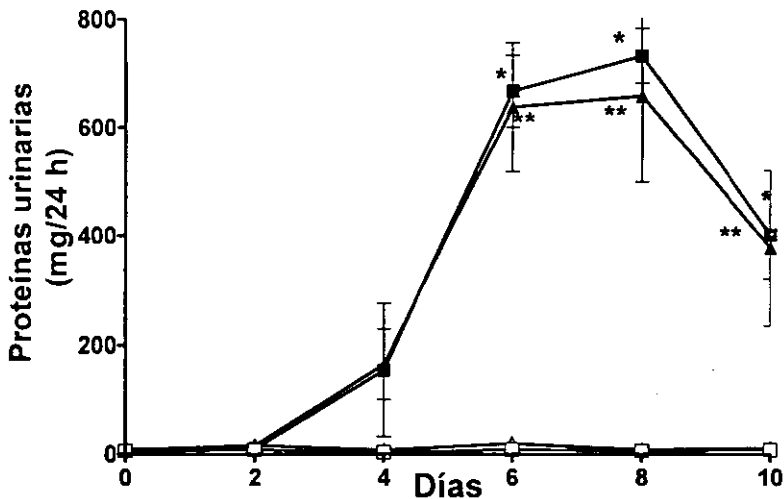


Figura 3. Proteínas urinarias de ratas alimentadas dos semanas con dieta estándar y dieta con ajo en polvo al 2%.

□ CT △ AJO ■ SN ▲ SNA. *p<0.001 vs CT; **p<0.001 vs AJO n=5

Determinaciones bioquímicas (Tabla 3)

Las proteínas totales, la albúmina en suero y la depuración de creatinina disminuyeron, los niveles de colesterol, de nitrógeno ureico y de creatinina en suero se incrementaron en los dos grupos nefróticos.

Tabla 3. Efecto de la alimentación con ajo en polvo al 2% durante dos semanas, antes de la inducción de SN en los parámetros bioquímicos en suero y en la depuración de creatinina de ratas control y nefróticas.

Grupo	Proteínas g/dl	Albumina g/dl	Colesterol mg/dl	Creatinina mg/dl	Depuración de creatinina ml/min	Nitrógeno ureico mg/dl
CT	5.7±0.2	3.2±0.1	50±4.8	0.4±0.06	1.6±0.3	23±3
CTA	5.5±0.5	3.1±0.1	48±8.	0.4±0.05	1.4±0.2	23±1
SN	3.9±0.4 *	1.9±0.3 *	229±41*	0.7±0.06 *	0.8±0.1 *	42±8
SNA	3.9±0.7 **	1.8±0.4 **	198±33**	0.7±0.1 **	0.6±0.1 **	54±19 **

* p< 0.001 vs CT y **p< 0.001 vs CTA. n=5. Para más detalles ver tabla 1.

Liperoxidación renal y defensas enzimáticas antioxidantes (Tabla 4)

No hubo diferencias en los niveles de liperoxidación. La actividad de la SOD total disminuyó únicamente en el grupo SN. Esto se debió a la disminución en la actividad de la fracción CuZn-SOD, ya que la MnSOD no cambió. La dieta con ajo en polvo impidió la disminución de fracción CuZn-SOD en los animales del grupo SNA. La actividad de CAT disminuyó en ambos grupos nefróticos. La actividad de esta enzima en el grupo de ratas control alimentadas con ajo en polvo, también disminuyó significativamente respecto al grupo con dieta estándar. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de GSH-Px plasmática y renal.

Tabla 4. Efecto de la alimentación con ajo en polvo al 2% durante dos semanas antes de la inducción de SN, en la liperoxidación (Lpx) renal y actividad de enzimas antioxidantes.

Grupo	Lpx nmol MDA/mg prot.	SOD total renal U/mg prot	MnSOD renal U/mg prot	CuZnSOD renal U/mg prot	CAT renal x/mg prot	GSH-Px renal U/mg prot	pGSH-Px U/ml
CT	0.14±0.02	32±3	10±3	22±3	0.27±0.05	0.13±0.02	1.5±0.16
CTA	0.20±0.06	28±2	12±2	17±2	0.17±0.04 †	0.14±0.02	1.5±0.24
SN	0.09±0.02	22±3*	8±1	15±2*	0.05±0.004 **	0.11±0.006	1.8±0.4
SNA	0.09±0.02	25±3	10±3	16±1*	0.04±0.012**	0.12±0.031	1.7±0.4

*p< 0.05 vs CT y/o CTA; ** p<0.001 vs CT y/o CTA; †p< 0.001 vs CT. n=5. Para más detalles ver tabla 1.

1.5 Cantidad renal de H₂O₂ *in vivo*

1.5.1 Cantidad renal de H₂O₂ *in vivo* en ratas control con dieta estándar y con dieta suplementada con ajo en polvo.

La tabla 5 muestra la cantidad renal de H₂O₂ *in vivo*, medido por el método de inhibición de CAT por ATZ.

Tabla 5. Efecto de la alimentación con ajo en polvo al 2% sobre la cantidad renal de H₂O₂ *in vivo*

Grupo	CT Catalasa (κ/mg prot.)	CTA Catalasa (κ/mg prot.)
etanol (+)	0.34±0.04 (8)	0.20±0.05** (8)
etanol (-)	0.18±0.03 (7)	0.16±0.02 (5)
% inhibición	46±10	21±8*

*p < 0.025 vs dieta estándar. **p < 0.001 vs dieta estándar. La n de cada experimento se encuentra entre paréntesis

El porcentaje de inhibición de CAT del grupo con dieta estándar y etanol (-) vs su control etanol (+) es de 46%, mientras que el grupo con ajo en polvo etanol (-) vs su control etanol (+) es de 21 %. La interpretación de estos datos, de acuerdo a la literatura (131,132,135,137), es la siguiente: la CAT es inhibida de manera irreversible por el ATZ cuando existe en el medio H₂O₂ formando un complejo ATZ-CAT-H₂O₂; por lo tanto, si la cantidad de H₂O₂ es mayor, la CAT se encontrará más inhibida. Por lo cual, de este experimento se puede concluir que la cantidad de H₂O₂ en las ratas alimentadas con ajo en polvo es menor que en las alimentadas con dieta estándar.

1.5.2 Cantidad renal de H₂O₂ *in vivo* en ratas con dieta estándar y con ajo en polvo, 10 días después de la inyección de ANP (Tabla 6)

Por otra parte, se midió también la cantidad de H₂O₂ en ratas alimentadas con ajo en polvo y con dieta estándar 10 días después de la inyección con ANP (75 mg/Kg). La tabla 6 muestra los resultados obtenidos de este experimento.

Tabla 6. Efecto de la alimentación con ajo en polvo al 2% sobre la cantidad renal *in vivo* de H₂O₂, 10 días después de la inyección de ANP.

Grupo	CT Catalasa (κ/mg prot.)	SN Catalasa (κ/mg prot.)	CTA Catalasa (κ/mg prot.)	SNA Catalasa (κ/mg prot.)
etanol (+)	0.33±0.03 (15)	0.20±0.09 (8)	0.20±0.04 (14)*	0.15±0.03 (9)
etanol (-)	0.20±0.030 (8)	0.10±0.02 (8)	0.16±0.02 (11)	0.09±0.01 (6)
% inhibición	38±9 (8)	52±9 (8) *‡	22±10 (11)***	41±4 (6) **

*p<0.05 vs SN, **p<0.001 vs CTA dieta estándar, ***p<0.01 vs CT ‡p<0.001 vs CTA

Se observó una disminución en la cantidad renal de H₂O₂ *in vivo* en el grupo CTA como se había demostrado previamente en la tabla 5. Hay una mayor cantidad renal de H₂O₂ *in vivo* en las ratas nefróticas de ambas dietas comparadas con sus grupos controles respectivamente, lo que nos puede sugerir que aún hay estrés oxidativo al aumentar por lo menos una de las ERO, 10 días después de haber inyectado ANP. La dieta con ajo en polvo no bloqueó el incremento en la cantidad de H₂O₂ en el grupo SNA.

Se ha reportado que el daño por ANP se lleva a cabo en los primeros quince minutos después de la inyección de ANP. Debido a que a través de este método no es posible evaluar la cantidad de H₂O₂ en este tiempo y a que no se conoce *in vivo* la participación de esta ERO en este modelo, se decidió estudiar la participación del H₂O₂ en el modelo de SN por ANP inhibiendo *in vivo* a la CAT con ATZ.

2. Efecto de la inhibición *in vivo* de CAT con ATZ sobre la magnitud del SN

Para determinar cuál era el mejor tiempo en el cual administrar el ANP después de la inyección con ATZ, se determinó el porcentaje de inhibición de CAT así como la concentración renal, hepática y urinaria de ATZ a diferentes tiempos: 3, 24, 48 y 96 h (1 g/Kg de peso ATZ). La Fig. 4 y la tabla 7 muestran el curso temporal de la inhibición de la CAT renal y hepática respectivamente, por ATZ. Se encontró una recuperación gradual de la actividad de CAT en ambos tejidos. La recuperación de su actividad *in vivo* se debe exclusivamente a la síntesis de *ново* de la proteína (37,138). El curso temporal de la recuperación de la actividad de CAT observada por nosotros es semejante a la que han reportado otros autores (133,139).

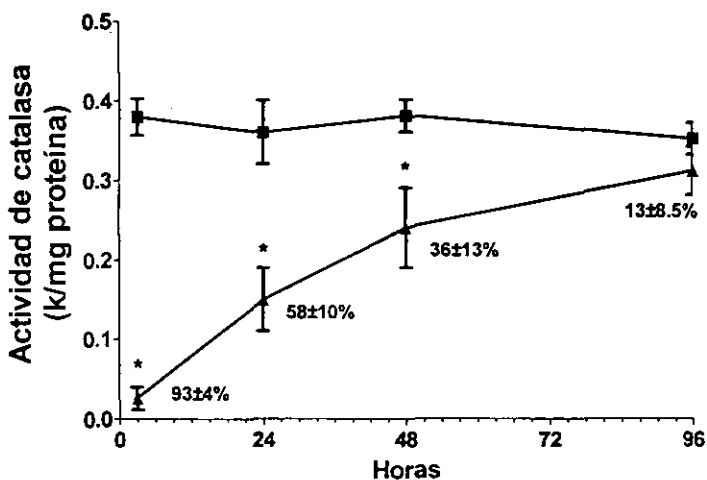


Figura 4. Curso temporal de la inhibición de catalasa renal por ATZ. \blacktriangle ATZ \blacksquare CONTROL * $p < 0.001$ vs CONTROL. Los números indican el % de inhibición de la catalasa.

Tabla 7. Curso temporal de la inhibición de CAT (1 g ATZ/Kg) en hígado. La actividad se expresa como (μ /mg proteína).

Grupo	3 h	24 h	48 h	96 h
CT	0.90±0.11 (3)	0.84±0.16 (5)	0.94±0.2 (2)	0.90±0.1 (3)
ATZ	0.08±0.05 (6) *	0.42±0.05 (4) *	0.70±0.06 (4) *	0.82±0.04 (6)
%inhibición	90±5	53±5.5	36±13	8.6±4.3

* $p < 0.01$ vs CT.

Determinación de ATZ

En la Fig. 5 y en la tabla 8 se muestra la concentración de ATZ renal y hepática, respectivamente, a las 3, 24, 48 y 96 h posteriores a la administración de ATZ. En ambos casos se observa que la concentración de ATZ aumenta sólo a las 3 h. En la Fig. 6 se muestra la excreción urinaria de ATZ durante los siguientes 7 días posteriores a su administración. De lo anterior concluimos que el ATZ es eliminado en las primeras 24 horas después de su administración. Existe en la literatura reportes sobre la existencia de sustancias en los tejidos y orina que reaccionan de la misma manera que el ATZ con el ácido cromotrópico (136), es por ello que en las figuras 5 y 6 se muestran "concentraciones basales" de ATZ.

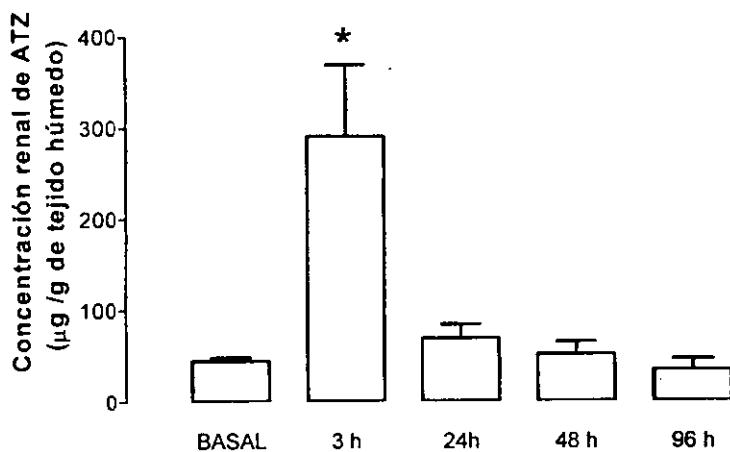


Figura 5. Curso temporal de la concentración renal de ATZ. * $p < 0.001$ vs BASAL

Tabla 8. Determinación de ATZ en hígado.

Grupo	0 h	3 h	24 h	48 h	96 h
ATZ	40±9 (6)	220±36 (6) *	50±12(5)	50±17 (6)	34±3 (6)

* $p < 0.01$ vs CT. Los datos están expresados como µg/g de tejido húmedo. La concentración a 0 h corresponde a ratas sin ATZ

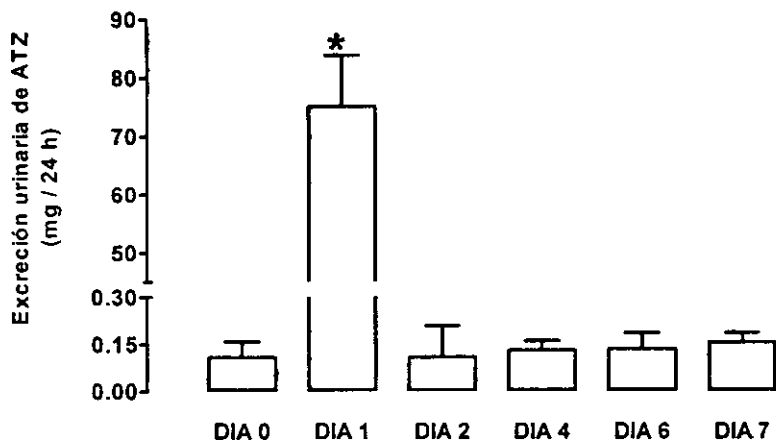


Figura 6. Curso temporal de la excreción urinaria de ATZ
 * $p < 0.001$ vs DIA 0

De las determinaciones anteriores se concluyó que el mejor tiempo para administrar ANP después de haber sido inhibida la CAT es 24 h más tarde, ya que en este momento el ATZ ha sido eliminado de hígado y riñón y la inhibición de la actividad de esta enzima es de un $58 \pm 10\%$.

En la Fig. 7 se observa el curso temporal de la proteinuria en los cuatro grupos de ratas estudiadas. Sólo los grupos inyectados con ANP (grupo ANP y ATZANP) desarrollaron proteinuria. Sin embargo, en el grupo (ATZ ANP) ésta empezó antes (día 4) y fue significativamente mayor que la del grupo ANP los días 6, 8, y 10. Lo que nos lleva a concluir que el inhibir en algún grado a la CAT renal incrementa el daño por ANP y que, por lo tanto, esto apoya nuestra hipótesis de que el H_2O_2 juega un papel muy importante en la patología de este modelo experimental.

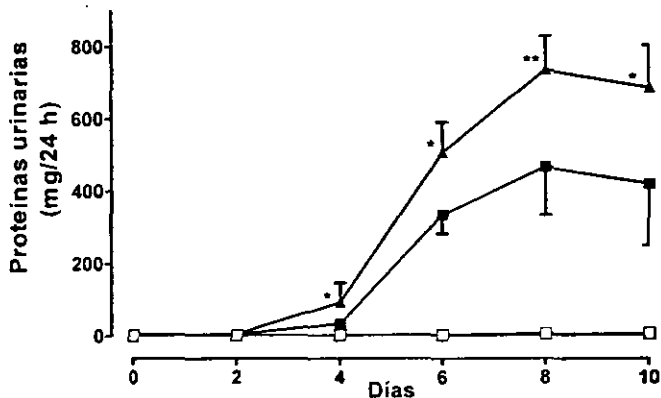


Figura 7. Proteínas urinarias de ratas tratadas con ATZ 24 h antes de la administración de ANP

□ CT △ ATZ ■ ANP ▲ ATZ+ANP

* $p < 0.01$ vs ANP; ** $p < 0.001$ vs ANP

En la tabla 9 y la Fig. 8 se muestran los resultados obtenidos en los parámetros bioquímicos de los grupos CT, ATZ, SN y ATZANP. El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas en los niveles de colesterol entre los grupos con ANP y ATZANP, así como en los de lipoperoxidación urinaria en los grupos nefróticos.

Tabla 9. Efecto del ATZ 24 h antes de la administración de ANP sobre los parámetros bioquímicos en plasma y depuración de creatinina de ratas control y nefróticas.

Grupo	Proteínas g/dl	Albúmina g/dl	Nitrógeno ureico mg/dl	Creatinina mg/dl	Depuración de creatinina ml/min
CT	6.1±0.9	2.8±0.3	29±4	0.5±0.1	1±0.01
ANP	6.0±0.5	1.9±0.4 *	37±12	0.8±0.2*	0.8±0.2*
ATZ	6.5±0.61	2.8±0.3	28±3	0.5±0.1	0.8±0.1
ATZANP	5.4±0.7 *	1.5±0.3 *	35±7	0.90±0.2 *	0.7±0.2*

* $p < 0.05$ vs ATZ, y/o CT. n=7. CT grupo control, ANP grupo con SN, ATZ grupo con ATZ, ATZANP grupo con SN tratado previamente con ATZ.

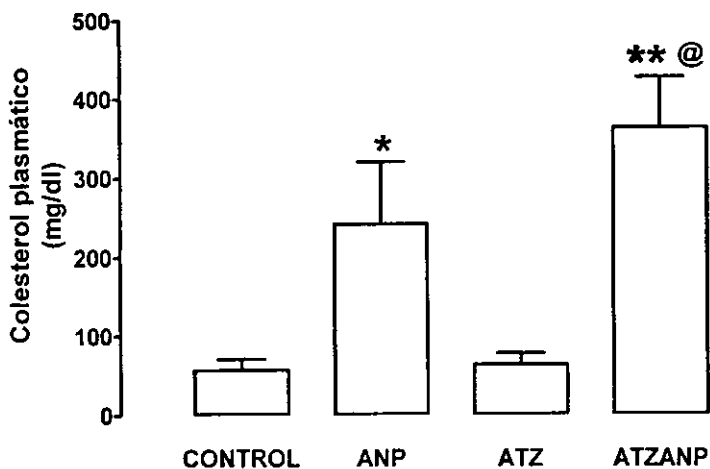


Figura 8. Efecto de la inhibición de la catalasa con ATZ en el colesterol plasmático de ratas con SN.

* $p < 0.05$ vs CONTROL; ** $p < 0.001$ vs ATZ; @ $p < 0.01$ vs ANP

En la Fig. 9 y la tabla 10 se muestran las actividades de las enzimas antioxidantes. La actividad de CAT disminuye significativamente en los grupos ATZANP y ANP vs su control respectivo, y no se encuentran diferencias entre ambos grupos nefróticos, lo que sugiere que esta disminución es exclusivamente debida al estado nefrótico.

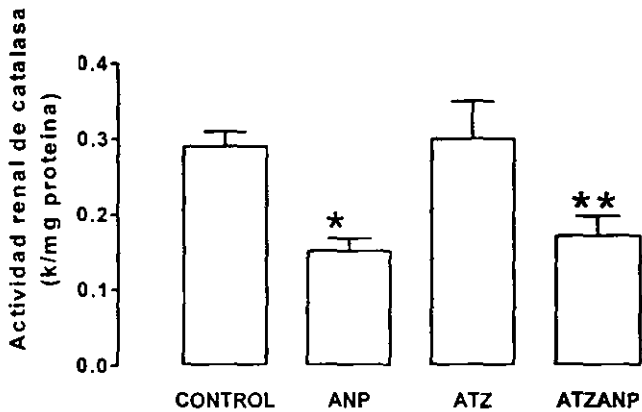


Figura 9. Actividad renal de CAT en el día 10.
* p<0.001 vs CONTROL; **p<0.001 vs ATZ

Tabla 10. Efecto del ATZ 24 h antes de la administración de ANP en la lipoperoxidación renal, urinaria y en la actividad de las enzimas antioxidantes de ratas control y nefróticas.

Grupo	GSH-Px renal U/mg prot	SOD total renal U/mg prot	GSH-Px plasmática U/ml
CT	0.19±0.02	20±6	2.7±0.5
ANP	0.15±0.026	21±3	3.2±0.6
ATZ	0.18±0.016	19±5	2.5±.4
ATZANP	0.17±0.017	24±4	2.6±0.2

* p< 0.001 vs CT y ATZ; **p<0.05 vs CT. n=7

A continuación se presentan los dos artículos que se derivaron de esta tesis.

Date: Thu, 21 Jan 1999 09:34:23 -0800 (PST)
X-Sender: frbm@rcf.usc.edu
To: Jose Pedraza <pedraza@servidor.unam.mx>
From: Kelvin Davies <frbm@almaak.usc.edu>
Subject: Re: DISKETTE OF Manuscript 2838-O-98
X-MIME-Autoconverted: from quoted-printable to 8bit by servidor.unam.mx id LAA22557
Content-Length: 1910

January 19, 1999

Dear Dr. Chaverri:

Manuscript : 2838-O-98

Authors : Jose Pedraza-Chaverri, Maria de los Angeles Granados-Silvestre,
Omar Noel Medina-Campos, Rogelio Hernandez-Pando

MS. Title : Effect of the In Vivo Catalase Inhibition on Aminonucleoside
Nephrosis

Receipt Date : 10/26/98

I am pleased to inform you that your revised manuscript has been accepted for publication in "FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE". Your cooperation with the reviewers, and with the review process in general is much appreciated.

Galley proofs of the article will be sent to you as soon as possible. A reprint order form will also be mailed to you in the near future.

Thank you for submitting your manuscript to "FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE".

Yours Sincerely,

Kelvin J. A. Davies, Ph.D., D.Sc.
Co-Editor-in-Chief

>
>
>

EFFECT OF THE *IN VIVO* CATALASE INHIBITION ON AMINONUCLEOSIDE NEPHROSIS

José Pedraza-Chaverri, María de los Ángeles Granados-Silvestre, Omar Noel Medina-Campos, Rogelio Hernández-Pando*

Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM), 04510, México, D.F., * Department of Experimental Pathology, National Institute of Nutrition "Salvador Zubirán", 14000 México D.F. México.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA (IN203797) and Facultad de Química (PAIP 6190-03) from National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Author for correspondence:

Dr. José Pedraza Chaverri
Facultad de Química, Edificio B
Segundo Piso, Lab 209
Ciudad Universitaria, UNAM
04510 México, D.F.
México

Tel (5) 622-35-15, Fax (5) 616-20-10 E-Mail <pedraza@servidor.unam.mx>

Running title: Catalase inhibition in nephrosis

EFFECT OF THE *IN VIVO* CATALASE INHIBITION ON AMINONUCLEOSIDE NEPHROSIS**ABSTRACT**

Reactive oxygen species have been involved in the pathophysiology of puromycin aminonucleoside (PAN)-nephrosis. The role of H_2O_2 in these rats may be studied modulating the amount or activity of catalase, which breakdowns H_2O_2 to water and oxygen. To explore the role of H_2O_2 in this experimental model, we studied the effect of the *in vivo* catalase inhibition with 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ) on the course of PAN-nephrosis. Four groups of rats were studied: control rats (CT group), PAN-injected rats (PAN group), ATZ-injected rats (ATZ group), and ATZ and PAN injected rats (ATZPAN group). Rats were placed in metabolic cages to collect 24 h urine along the study, ATZ (1 g/Kg) was given 24 h before PAN injection (75 mg/Kg), and the proteinuria was measured on days 0, 2, 4, 6, 8, and 10. Proteinuria started before (day 4) and was significantly higher on days 6, 8, and 10 in the ATZPAN group than in the PAN group. On day 10, hypercholesterolemia was significantly higher in the ATZPAN group than in the PAN group. These data indicate that the *in vivo* catalase inhibition magnifies PAN-nephrosis, suggesting that H_2O_2 is produced *in vivo* and involved in the renal damage in this experimental disease.

Key Words: catalase, puromycin aminonucleoside, aminotriazole, nephrosis, proteinuria, hypercholesterolemia, nephrotic syndrome.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated in the pathophysiology of puromycin aminonucleoside (PAN)-nephrosis [1-10]. It has been clearly established that PAN induces the production of ROS *in vitro* [1,6]. The addition of PAN to glomerular epithelial cells in culture or kidney slices, induces clearly the increase in hydroxyl radicals [1], H_2O_2 [1,6], and superoxide anions [1]. In contrast, it has been more difficult to measure the individual ROS in PAN-nephrosis *in vivo*. However, there are strong indirect evidences that hydroxyl radicals [5,11], superoxide anions [2,4,12], and H_2O_2 [2] are involved in PAN-nephrosis *in vivo*. In this experimental model, proteinuria begins some days after PAN injection. However, there are evidences of oxidant stress [10,13] and production of ROS [14] before the beginning of proteinuria. More recently, Gwinner *et al.* [14], performed a time-course study to measure specific ROS in glomeruli isolated from PAN-nephrotic rats using luminol and lucigenin, in combination with radical the scavengers superoxide dismutase, dimethyl thiourea, and catalase. They used this combination of reagents due to lucigenin and luminol are not completely specific for a particular ROS [15]. They suggested that hydroxyl radicals and H_2O_2 are involved 15 minutes after PAN injection, and superoxide anions and hydroxyl radicals are involved nine days after PAN injection [14]. However, since the quantification of a particular radical is not possible using chemiluminiscent reagents, these data should be taken with caution [14].

On the other hand, the injection of catalase to animals [2,4] or the addition of this enzyme to the culture medium [6,16] has been used to probe the role of H_2O_2 in PAN nephrotoxicity. However, there are contradictory data. Beaman *et al.* [2] and Kawaguchi *et al.* [6] found a protective role, however Diamond *et al.* [4] and Ghiggeri *et al.* [16] did not find this protective role.

Taking into account all the above information, we think that additional experiments are required to clarify the role of H_2O_2 in the pathophysiology of PAN-nephrosis *in vivo*. Therefore, we made this study using a different experimental approach to that used by other authors *in vivo* [2,4]. We inhibited renal catalase *in vivo* with 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ) which reacts with this enzyme to form irreversibly inactivated catalase only in the presence of H_2O_2 [17]. We hypothesized that the *in vivo* catalase inhibition would enhance renal damage in these rats if H_2O_2 is involved in PAN-nephrosis. In this study, PAN-nephrosis was induced in rats treated previously with ATZ and the course of proteinuria and other biochemical parameters were compared with rats injected only with PAN.

Materials and Methods

Reagents

PAN, ATZ, reduced glutathione (GSH), glutathione reductase, NADPH, and the kit to measure plasma albumin were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Commercial kits to measure cholesterol, creatinine and urea nitrogen were purchased from Farmacéuticos Lakeside (México, D.F.). H_2O_2 was from Mallinckrodt (Paris, Kentucky). All other chemicals were reagent grade and commercially available.

Experimental design

Twenty eight male Wistar rats, weighing 150-200 g, were used. Four groups of 7 animals each one were studied: 1. control (CT) group, rats injected with a single subcutaneous injection of 0.9% saline solution; 2. PAN group, rats injected with a single subcutaneous injection of a 2% PAN solution in 0.9% saline b. w. (75 mg/Kg) [18]; 3. ATZ group, rats injected intraperitoneally with 1 g/Kg of ATZ [19]; and 4. ATZPAN group, rats injected intraperitoneally with 1 g/Kg of ATZ and 24 h after, with 75 mg/Kg PAN. The days when ATZ and PAN were injected were defined as days -1 and 0, respectively. Along the study, the animals were placed in individual metabolic cages (Allentown Caging Equipment Co., Allentown, NJ, USA) and 24-h urine samples were collected every 2 days to determinate total protein in all groups, and ATZ on days -1 (basal), 1, 2, 4, 6, and 7 in ATZ and ATZPAN groups. On day 10 after PAN or saline injection, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital and sacrificed by cardiac puncture. Blood was collected on ice with 0.1 ml of 250 mM disodium EDTA to obtain plasma. Plasma was stored at $-40^{\circ}C$ until the following biochemical determinations were made: total protein, cholesterol, albumin, creatinine and urea nitrogen. To calculate creatinine clearance on day 10, urine creatinine was also measured in this day. Kidneys were quickly removed and rinsed with cold 0.9% NaCl, weighed and homogenized in a Polytron for 10 seconds in cold 50 mM potassium phosphate, 0.1% Triton X-100, pH=7.0. The homogenate was centrifuged at 19,000 x g and $4^{\circ}C$ for 30 min. The supernatant was separated to measure total protein and the activities of catalase and glutathione peroxidase.

In a separate group of male Wistar rats weighing 150-200 g, the time-course changes in renal and hepatic catalase activity and ATZ concentration at 3, 24, 48 and 96 h after ATZ injection was studied. Basal data were obtained from rats not injected with ATZ. Rats were euthanized with ether and kidneys and liver were quickly removed, homogenized as described above and divided in two portions. One portion was processed as above to measure catalase activity and total protein. The other portion was treated with 10% trichloroacetic acid (1:1), and centrifuged at $2,700 \times g$ and room temperature for 10 min. The supernatant was separated to measure the ATZ concentration.

Analytical methods

Total protein, cholesterol, albumin, and urea nitrogen in plasma, total protein in kidney and liver, and creatinine in plasma and urine were measured by spectrophotometric methods previously used [18]. Total protein in urine was measured by a turbidimetric method with 12.5% trichloroacetic acid. The standard curve was constructed with albumin (0.04 - 0.8 mg/ml) and the samples were read at 420 nm.

The ATZ concentration in urine and in kidney and liver homogenates were determined spectrophotometrically by coupling of diazotized ATZ to 4,5 dihydroxy-naphthalene-2,7 disulfonic acid (chromotropic acid) to form a color derivative, which was read at 525 nm [20].

Catalase

Catalase activity, in complete renal and hepatic homogenates, was assayed at $25^{\circ}C$ by the method of Aebi [21] based on the disappearance of 10 mM H_2O_2 at 240 nm. Under the conditions

Catalase inhibition in nephrosis

described, the decomposition of H_2O_2 by catalase contained in the samples follows a first-order kinetic as given by the equation

$$\kappa = 2.3/t \log A_0/A$$

where κ is the first-order reaction rate constant, t is the time over which the decrease of H_2O_2 , due to catalase activity, was measured (15 s), and A_0/A is the optical density at times 0 and 15 s, respectively.

Glutathione peroxidase

Renal glutathione peroxidase activity was assayed by the method of Lawrence and Burk [22] as described previously [9]. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate pH=7.0, 1 mM EDTA, 1 mM NaN_3 , 0.2 mM NADPH, 1 U/ml of the glutathione reductase, and 1 mM GSH. Homogenates (0.1 ml) were added to 0.8 ml of mixture and allowed to incubate for 5 min. at room temperature before initiation of the reaction by the addition of 0.1 ml 0.25 mM H_2O_2 solution. Absorbance at 340 nm was recorded for 5 min. and the activity was calculated from the slope of these lines as μ moles NADPH oxidized per min. Blank reactions with homogenates replaced by distilled water were subtracted from each assay.

Tissue processing for electron microscopy studies

Kidney was prepared for ultrastructural studies as described previously [9].

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm SD. One way analysis of variance followed by Bonferroni t test was used to compare the data of the four groups. Non-paired t test was used to compare the renal and hepatic catalase activity after ATZ injection. One way analysis of variance followed by multiple comparisons according to the method of Dunnett was used to compare the renal, hepatic, and urine concentration of ATZ. These statistical analyses were made using the software Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). P values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Time-course inhibition of renal catalase by ATZ and renal handling of ATZ

Before to study the effect of ATZ on PAN-nephrosis, we made previous experiments to choose the appropriate time to inject PAN after ATZ treatment. Therefore we measured the renal catalase activity, and the renal concentration and the urinary excretion of ATZ after a single injection of this inhibitor. Fig. 1 shows the time-course activity of renal catalase in saline and ATZ-treated rats. The lowest value of catalase activity, after ATZ injection, was reached at 3 h (93 \pm 4 % of inhibition, $p < 0.001$), then increased progressively at 24 h (58 \pm 10% of inhibition, $p < 0.001$), 48 h (36 \pm 13% of inhibition, $p < 0.001$), and 96 h when the inhibition of 13 \pm 8.5% was not significant. A similar pattern of catalase inhibition was observed in liver (data not shown). The ATZ renal concentration increased at 3 h and returned to basal values at 24 h (Fig. 2). Similar observation was made in the ATZ liver concentration (data not shown). According to the above data, ATZ was excreted by urine during the first 24 h (Fig. 3); on days 2, 4, 6, and 7 ATZ urine concentration was similar to the basal values (Fig. 3). This same pattern of ATZ concentration was observed in the ATZPAN group (data not shown). This means that PAN did not modify the renal handling of ATZ. The time chosen to give PAN to rats was 24 h after ATZ injection. This was due to catalase activity was significantly inhibited (58 \pm 10%), and the kidney has no ATZ (Fig. 2), which would probably interfere with PAN nephrotoxicity. ATZ-like chromogenic substances are responsible for the values observed in kidney, liver and urine from control rats [20].

Effect of ATZ on PAN-nephrosis

Fig. 4 shows the time-course of proteinuria in the four groups of rats. Rats from CT and ATZ groups did not develop proteinuria. In contrast both groups of rats injected with PAN developed proteinuria, however, the magnitude of proteinuria was clearly higher in those rats previously treated with ATZ (ATZPAN group). In addition, proteinuria began before in ATZPAN group (day 4) than in PAN group (day 6). Interestingly, the damage to the podocyte ultrastructure on day 10 was higher in the ATZPAN group than in the PAN group (Fig. 5). Glomeruli from rats treated with PAN showed many capillaries with visceral epithelial cells foot processes effacement. In the same glomerulus, some capillaries had a mild pedicelle fusion due to the presence of individualized swollen foot processes (Fig. 5A). In contrast, animals from the ATZPAN group showed a diffuse pedicelle fusion and numerous lipid laden macrophages localized in the mesangial matrix (Fig. 5B). This strongly suggests that the enhanced proteinuria in the ATZPAN group is secondary to a more severe glomerular epithelial cell damage. Fig. 6 shows plasma cholesterol levels on day 10 in the four groups of rats. Plasma cholesterol was similar in CT and ATZ groups. PAN-treated rats developed hypercholesterolemia. However, this was significantly higher in the ATZPAN group than in the PAN group.

Other data obtained on day 10 are showed in Table 1. Total protein, albumin, creatinine and urea nitrogen in plasma and creatinine clearance were similar in CT and ATZ groups. Total plasma protein decreased significantly only in the ATZPAN group. Plasma albumin decreased, plasma creatinine increased and creatinine clearance decreased in PAN and in ATZPAN groups. However, the previous treatment with ATZ did not magnify these alterations in nephrotic animals. PAN treatment did not induce changes in plasma urea nitrogen. ATZ administration had no adverse effects on body weight in control and PAN-treated rats (data not shown).

Effect of PAN on catalase and glutathione peroxidase activities

Fig. 7 shows the renal catalase activity on day 10 in the four groups of rats. Renal catalase activity was similar in CT and ATZ groups. Rats from PAN and ATZPAN groups have a decreased activity of this enzyme, however, the previous treatment of ATZ did not induce additional changes in control or PAN-treated rats. This is consistent with the observation made in Fig. 2 which shows that renal catalase activity returned to control values, 4 days after ATZ injection. Renal glutathione peroxidase activity remained unchanged on day 10 in the four groups studied: 0.18 ± 0.016 , 0.15 ± 0.026 , 0.15 ± 0.020 , and 0.17 ± 0.015 μ moles NADPH oxidized per min./mg protein for CT, PAN, ATZ, and ATZPAN groups, respectively ($P = NS$).

DISCUSSION

There are *in vivo* [2,4,5,7-10,12,14,23] and *in vitro* [1,6] evidences that ROS are involved in PAN nephrotoxicity. ROS have been quantified after the addition of PAN to renal cells in culture [1,6]. However, the evidences of the production of individual ROS *in vivo* has been obtained indirectly using antioxidant enzymes [2,4,12], dimethyl thiourea, [5], and luminol and lucigenin in combination with the above reagents [14]. The addition of catalase to the culture medium [6,16] or the injection of this enzyme to the rats [2,4] has been used to search if H_2O_2 is involved in PAN-nephrotoxicity. However, the protective effect of catalase [2,6,24] has not been seen by all the authors [4,16]. In this work we explored the *in vivo* role of H_2O_2 in this experimental disease, modulating the activity of catalase with ATZ, which is a specific inhibitor of this enzyme [17,19]. ATZ inhibits irreversibly catalase only in the presence of H_2O_2 [17]. It has been clearly demonstrated that a single injection of aminotriazole to rats is able to inhibit renal glomerular and tubular catalase activity approximately at the same extent [25]. This strongly suggests that the inhibition observed in complete renal homogenates of our rats is consequence of both glomerular and tubular catalase inhibition. The time-course inhibition of renal and hepatic catalase activity by ATZ and the renal handling of catalase observed in this study is

Catalase inhibition in nephrosis

similar to the observed by other authors [19,26]. The recuperation of catalase activity *in vivo* is due to a new synthesis of proteins [27,28]. We did not find any evidence of adverse effects of ATZ administration in our rats. In fact total protein, albumin, creatinine, urea nitrogen, and cholesterol in plasma, creatinine clearance, proteinuria and body weight values were similar in control and ATZ groups (see Table 1 and Figs. 4 and 6).

Our data strongly suggest that H_2O_2 is produced *in vivo* and involved in the pathophysiology of PAN-nephrosis since the catalase inhibition exacerbated the renal damage in these rats. This was made evident by the hypoproteinemia and the enhanced proteinuria and hypercholesterolemia in the ATZPAN group. The lack of effect of ATZ on urinary excretion of total protein in the ATZ group may suggest that ATZ did not modify the tubular reabsorption of proteins. This and the higher glomerular epithelial cells damage in the ATZPAN group, strongly suggest that the enhanced proteinuria in the ATZPAN group is due to enhanced glomerular damage and not to changes in tubular reabsorption.

According to the time-course catalase inhibition after ATZ injection, the increase of H_2O_2 should occur at any time before day 4 after PAN-injection, that is, when renal catalase activity was decreased (see Fig. 1) and before the beginning of proteinuria (days 4-6). These data are in complete agreement with the evidence of renal oxidant stress [10,13] and the increase in ROS [14] before the appearance of proteinuria. Gwinner *et al.* [14], clearly demonstrated that ROS are increased in glomeruli isolated from rats as early as 15 minutes after PAN injection. They postulated that the major ROS at this time were H_2O_2 and hydroxyl radical [14].

The adverse effect of catalase inhibition on PAN-nephrosis suggests that the administration of exogenous catalase might be beneficial. Our data support the findings of Beaman *et al.* [2] who found that catalase administration has a beneficial effect on PAN-nephrosis and those of Kawaguchi *et al.* [6] and Zent *et al.* [24] who found that catalase protected renal cells in culture from PAN toxicity.

Paller [29] also used the *in vivo* inhibition of catalase with ATZ to explore the role of this enzyme and the H_2O_2 in rats with ischemic renal injury, other experimental model in which ROS are involved. He observed that the previous treatment with ATZ exacerbated the renal damage in these rats which supported the *in vivo* role of H_2O_2 in the ischemic renal injury.

We also found that renal catalase activity decreased in PAN-nephrotic rats on day 10. The low activity of catalase in PAN-nephrotic rats may contribute to enhance the damage induced by ROS. In contrast, renal glutathione peroxidase activity, which also breakdowns H_2O_2 to water, remained unchanged in this same day in the four groups studied. This is consistent with previous findings [10] and indicates a differential regulation between catalase and glutathione peroxidase in PAN-nephrotic rats. Other authors [14,30-32] have found that glomerular catalase activity is decreased in PAN-treated rats, which is in complete agreement with our findings. In addition, Gwinner *et al.* [14] found that renal catalase levels (measured by Western blot) are decreased, but catalase mRNA levels are unchanged. Therefore, they suggested that catalase activity decreased as a consequence of the low amount of catalase. It has been found that catalase gene expression may be regulated at various levels: gene transcription [33], mRNA stability [34,35], catalase degradation [36], and translational efficiency [37]. Which mechanism(s) is/are responsible(s) of the low values of catalase in PAN-nephrosis remains to be determined. However, inhibition of protein synthesis, secondary to PAN, can be ruled out as a possible mechanism due that it has been completely demonstrated that PAN is not an inhibitor of protein synthesis [38-40]. PAN is different of puromycin which is a recognized inhibitor of protein synthesis [39,40].

The relation between oxidant stress and regulation of catalase also deserves an additional commentary. Although, one could expect that catalase increased, as a consequence of the oxidant stress in these rats, to enhance renal antioxidant defense, it has been found that the response of catalase to the oxidant stress is not predictable. There are evidences that catalase activity and/or gene expression is decreased [41-43], unchanged [44], or increased [33,34,45] during oxidant stress.

Catalase inhibition in nephrosis

More studies are required to understand the relation between catalase and oxidant stress in PAN-nephrosis.

It is very interesting to note that, on day 10, catalase activity was not decreased additionally in the ATZPAN group. This suggests that the differences in the PAN and ATZPAN groups are due solely to the inhibition of renal catalase before day 4. The adverse consequences of catalase inhibition could be due to a direct toxic effect of H_2O_2 or to the ability of H_2O_2 to be further reduced to hydroxyl radical in the Haber-Weiss reaction [46]. In fact, it has been found that hydroxyl radicals depolymerizes glomerular heparan sulfate [47], and ROS increases albumin permeability in rat glomeruli [48] and decreases *de novo* synthesis of glomerular proteoglycans [49].

The mechanism(s) leading to increased renal ROS levels in PAN nephrosis remains largely unknown. Diamond *et al.* [4] postulated that hypoxanthine, an intermediary metabolite of PAN [16], could act as a substrate for renal xanthine oxidase, thereby generating ROS. This proposal was based on the facts that allopurinol (an inhibitor of xanthine oxidase) or superoxide dismutase (a superoxide anion scavenging enzyme) given to PAN-treated rats reduced renal damage [4]. More recently Nosaka *et al.* [50] found that 2'-deoxycofomycin, an inhibitor of the enzyme adenosine deaminase which is involved in the PAN metabolism [16], prevented PAN toxicity *in vivo* and *in vitro*. These findings support the involvement of purine metabolism and xanthine oxidase in PAN nephrotoxicity. However the mechanism involving xanthine oxidase has been challenged by Ginevri *et al.* [51], Ricardo *et al.* [1,3], Ghiggeri *et al.* [16], and Kawaguchi *et al.* [6]. The administration of tungsten (an inhibitor of xanthine oxidase) did not prevent PAN toxicity *in vivo* [3,51], in spite that renal xanthine oxidase was clearly inhibited. In addition, the administration of hypoxanthine to rats did not induce proteinuria [51] or the addition of this intermediate to kidney slices did not induce ROS or alterations in renal cells morphology [1]. Moreover, it was found that the addition of allopurinol or superoxide dismutase to cultured rat glomerular epithelial cells did not protect them against PAN toxicity [6], which argues against the role of xanthine oxidase in the generation of ROS in PAN nephrotoxicity. Additional studies are required to know the mechanism(s) by which ROS are increased in PAN-injected rats.

In summary, our data indicate that the *in vivo* catalase inhibition with ATZ, before the beginning of proteinuria, magnifies PAN-nephrosis in rats. In addition, renal catalase activity, but not renal glutathione peroxidase activity, decreased 10 days after PAN injection. This inhibition is independent of the catalase inhibition by ATZ since catalase returned to control values 4 days after ATZ injection.

In conclusion, our data strongly suggest that renal H_2O_2 is produced *in vivo* and involved in the renal damage in PAN-nephrotic rats.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA (IN203797) and Facultad de Química (PAIP 6190-03) from National Autonomous University of Mexico (UNAM).

List of Abbreviations

PAN - puromycin aminonucleoside

ATZ - 3-amino-1,2,4-triazole

H_2O_2 - hydrogen peroxide

ROS - Reactive oxygen species

CT group - rats injected with 0.9% saline solution;

PAN group - rats injected with 75 mg/Kg of PAN

ATZ group - rats injected with 1 g/Kg of ATZ

ATZPAN group - rats injected with 1 g/Kg of ATZ and 75 mg/Kg PAN.

GSH - reduced glutathione

NADPH -nicotine adenine dinucleotide reduced
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

REFERENCES

1. Ricardo, S. D.; Bertram, J. F.; Ryan, G. B. Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis: *in vitro* studies. *Kidney Int.* **45**:1057-1069; 1994.
2. Beaman, M.; Birtwistle, R.; Howie, A. J.; Michael, J.; Adu, D. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin. Sci.* **73**:329-332; 1987.
3. Ricardo, S. D.; Bertram, J. F.; Ryan, G. B. Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol. *Exp. Nephrol.* **3**:270-279; 1995.
4. Diamond, J. R.; Bonventre, J. V.; Karnovsky, M. J. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* **29**:478-483; 1986.
5. Thakur, V.; Walker, P. D.; Shah, S. V. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. *Kidney Int.* **34**:494-499; 1988.
6. Kawaguchi, M.; Yamada, M.; Wada, H.; Okigaki, T. Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury *in vitro* caused by puromycin aminonucleoside. *Toxicology* **72**:329-340; 1992.
7. Ricardo, S. D.; Bertram, J. F.; Ryan, G. B. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside-treated rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **4**:1974-1986; 1994.
8. Fawcett, J. P.; Schiller, B.; Jiang, R.; Moran, J.; Walker, R. J. Supplementation with L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, a cysteine precursor, does not protect against lipid peroxidation in puromycin aminonucleoside-induced nephropathy. *Exp. Nephrol.* **4**:248-252; 1996.
9. Pedraza-Chaverri, J.; Arévalo, A. E.; Hernández-Pando, R.; Larriva-Sahd, J. Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**:683-691; 1995.
10. Pedraza-Chaverri, J.; Arévalo, A. E. Tissue lipoperoxidation and glutathione peroxidase activity in puromycin aminonucleoside injected rats. *Int. J. Biochem.* **26**:1139-1145; 1994.
11. Ueda, N.; Baliga, R.; Shah, S. V. Role of 'catalytic' iron in an animal model of minimal change nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **49**:370-373; 1996.
12. Nishimura, Y.; Nakayama, M.; Sato, T.; Tomita, K.; Inoue, M. Inhibition of puromycin-induced renal injury by a superoxide dismutase derivative with prolonged *in vivo* half-life. *Nephron* **70**:460-465; 1995.
13. Fawcett, J. P.; Jiang, R.; Walker, R. J. Time course of lipid peroxidation in puromycin aminonucleoside-induced nephropathy. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **86**:227-234; 1994.
14. Gwinner, W.; Landmesser, U.; Brandes, R. P.; Kubat, B.; Plasger, J.; Eberhard, O.; Koch, K. M.; Olbricht, C. J. Reactive oxygen species and antioxidant defense in puromycin aminonucleoside glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**:1722-1731; 1997.
15. Kahl, R.; Weimann, A.; Weinke, S.; Hildebrandt, A. G. Detection of oxygen activation and determination of the activity of antioxidants towards reactive oxygen species by use of the chemiluminescent probes luminol and lucigenin. *Arch. Toxicol.* **60**:158-162; 1987.
16. Ghiggeri, G. M.; Cercignani, G.; Ginevri, F.; Bertelli, R.; Zetta, L.; Greco, F.; Candiano, G.; Trivelli, A.; Gusmano, R. Puromycin aminonucleoside metabolism by glomeruli and glomerular epithelial cells *in vitro*. *Kidney Int.* **40**:35-42; 1991.

Catalase inhibition in nephrosis

17. Margoliash, E.; Novogrodsky, A.; Schejter, A. Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem. J.* **74**:339-348; 1960.
18. Cruz, C.; Correa-Rotter, R.; Mézquita, C.; Medina-Campos, O. N.; Pedraza-Chaverri, J. Ascites fluid of nephrotic rats: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis protein pattern and the renin-angiotensin system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**:568-571; 1998.
19. Heim, W. G.; Appleman, D.; Pyfrom, H. T. Production of catalase changes in animals with 3-amino-1,2,4-triazole. *Science* **122**:693-694; 1955.
20. Green, F. O.; Feinstein, R. N. Quantitative estimation of 3-amino-1,2,4-triazole. *Anal. Chem.* **29**:1658-1660; 1957.
21. Aebi, H. E. Catalase. In: Bergmeyer, H. U., ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1983:273-282.
22. Lawrence, R. A.; Burk, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**:952-958; 1976.
23. Lee, H. S.; Jeong, J. Y.; Kim, B. C.; Kim, Y. S.; Zhang, Y. Z.; Chung, H. K. Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **51**:1151-1159; 1997.
24. Zent, R.; Ailenberg, M.; Waddell, T. K.; Downey, G. P.; Silverman, M. Puromycin aminonucleoside inhibits mesangial cell-induced contraction of collagen gels by stimulating production of reactive oxygen species. *Kidney Int.* **47**:811-817; 1995.
25. Guidet, B. R.; Shah, S.V. In vivo generation of hydrogen-peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am. J. Physiol.* **256**:F158-F163; 1989.
26. Fang, S. C.; George, M.; Yu, T. C. Metabolism of 3-amino-1,2,4-triazole-5-C¹⁴ by rats. *Agric. Food Chem.* **12**:219-223; 1964.
27. Crane, D.; Holmes, R. S.; Masters, C. J. On the relative rates of synthesis and degradation of catalase in vertebrate tissues. *Int. J. Biochem.* **9**:589-596; 1978.
28. Price, V. E.; Sterling, W. R.; Tarantola, V. A.; Hartley, R. W.; Rechcigl, M. The kinetics of catalase synthesis and destruction *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **237**:3468-3475; 1962.
29. Paller, M. S. Hydrogen peroxide and ischemic renal injury: effect of catalase inhibition. *Free Rad. Biol. Med.* **10**:29-34; 1991.
30. Wang, J. S.; Yang, A. H.; Chen, S. M.; Young, T. K.; Chiang, H.; Liu, H. C. Amelioration of antioxidant enzyme suppression and proteinuria in cyclosporin-treated puromycin nephrosis. *Nephron* **65**:418-425; 1993.
31. Hattori, T.; Ito, M.; Suzuki, Y. Studies on antinephritic effect of TJ-8014, *Syo-Saiko-To-Kyo-Shyokyo-Ka-Ouren-Bukuryou* (5): effects on puromycin aminonucleoside nephrosis and its mechanisms. *Japan. J. Pharmacol.* **56**:465-473; 1991.
32. Kawamura, T.; Yoshioka, T.; Bills, T.; Fogo, A.; Ichikawa, I. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int.* **40**:291-301; 1991.
33. Lai, C.-C.; Peng, M.; Huang, L.; Huang, W.-H.; Chiu, T. H. Chronic exposure of neonatal cardiac myocytes to hydrogen peroxide enhances the expression of catalase. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**:1157-1163; 1996.
34. Tacchini, L.; Pogliaghi, G.; Radice, L.; Bernelli-Zazzera, A.; Cairo, G. Post-transcriptional control of increased hepatic catalase gene expression in response to oxidative stress. *Redox Report* **2**:273-278; 1996.
35. Clerch, L. B.; Iqbal, J.; Massaro, D. Perinatal rat lung catalase gene expression: influence of corticosteroid and hyperoxia. *Am. J. Physiol.* **260**:L428-L433; 1991.

Catalase inhibition in nephrosis

36. Rechcigl, M. Jr.; Heston, W. E. Genetic regulation of enzyme activity in mammalian system by the alteration of the rates of enzyme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**:119-124; 1967.
37. Dhahbi, J. M.; Tillman, J. B.; Cao, S.; Mote, P. L.; Walford, R. L.; Spindler, S. R. Caloric intake alters the efficiency of catalase mRNA translation in the liver of old female mice. *J. Gerontol.* **53A**:B180-B185; 1998.
38. Coers, W.; Huitema, S.; van der Horst, M. L. C.; Weening, J. J. Puromycin aminonucleoside and adriamycin disturb cytoskeletal and extracellular matrix protein organization, but not protein synthesis of cultured glomerular epithelial cells. *Exp. Nephrol.* **2**:40-50; 1994.
39. Sidhu, J. S.; Omiecinski, C. J. Protein synthesis inhibitors exhibit a nonspecific effect on phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**:4769-4775; 1998.
40. Chow, S. C.; Peters, I.; Orrenius, S. Reevaluation of the role of *de novo* protein synthesis in rat thymocyte apoptosis. *Exp. Cell Res.* **216**:149-159; 1995.
41. Nath, K. A.; Grande, J.; Croatt, A.; Haugen, J.; Kim, Y.; Rosenberg, M. E. Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor- β 1 and collagen gene expression. *Kidney Int.* **53**:367-381; 1998.
42. Ohtake, T.; Kimura, M.; Nishimura, M.; Hishida, A. Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin-induced nephropathy. *J. Lab. Clin. Med.* **129**:81-88; 1997.
43. Singh, I.; Gulati, S.; Orak, J. K.; Singh, A. K. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol. Cell. Biochem.* **125**:97-104; 1993.
44. Nath, K. A.; Croatt, A. J.; Likely, S.; Behrens, T. W.; Warden, D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int.* **50**:1032-1043; 1996.
45. Yoshioka, T.; Bills, T.; Moore-Jarrett, T.; Greene, H. L.; Burr, I. M.; Ichikawa, I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int.* **38**:282-288; 1990.
46. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol.* **186**:1-85; 1990.
47. Raats, C. J. I.; Bakker, M. A. H.; van den Bom, J.; Berden, J. H. M. Hydroxyl radicals depolymerize glomerular heparan sulfate *in vitro* and in experimental nephrotic syndrome. *J. Biol. Chem.* **272**:26734-26741; 1997.
48. Dileepan, K. N.; Sharma, R.; Stechschulte, D. J.; Savin, V. J. Effect of superoxide exposure on albumin permeability of isolated rat glomeruli. *J. Lab. Clin. Med.* **121**:797-804; 1993.
49. Kashihara, N.; Watanabe, Y.; Makino, H.; Wallner, E. I.; Kanwar, Y. S. Selective decreased *de novo* synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:6309-6313; 1992.
50. Nosaka, K.; Takahashi, T.; Nishi, T.; Imaki, H.; Suzuki, T.; Suzuki, K.; Kurokawa, K.; Endou, H. An adenosine deaminase inhibitor prevents puromycin aminonucleoside nephrotoxicity. *Free Rad. Biol. Med.* **22**:597-605; 1997.
51. Ginevri, F.; Gusmano, R.; Oleggini, R. Renal purine efflux and xanthine oxidase activity during experimental nephrosis in rats: difference between puromycin aminonucleoside and adriamycin nephrosis. *Clin. Sci.* **293**:283-293; 1990.

Table 1. Biochemical data in plasma on day 10 in the four groups.

Group	Total protein g/dl	Albumin g/dl	Creatinine mg/dl	Creatinine clearance ml/min	Urea nitrogen mg/dl
CT	6.12 ± 0.92	2.80 ± 0.30	0.45 ± 0.10	1.00 ± 0.08	29.00 ± 4.50
PAN	6.00 ± 0.52	1.90 ± 0.40*	0.80 ± 0.20*	0.76 ± 0.24*	37.00 ± 11.60
ATZ	6.50 ± 0.61	2.80 ± 0.30	0.45 ± 0.10	0.80 ± 0.10	28.00 ± 3.00
ATZPAN	5.40 ± 0.70*	1.50 ± 0.30*	0.90 ± 0.20*	0.68 ± 0.18*	35.00 ± 6.80

Values are mean ± SD. Abbreviations: CT, control rats; ATZ, rats with aminotriazole; PAN, rats with nephrotic syndrome; ATZPAN, rats with aminotriazole and nephrotic syndrome. n=7 for each group. *p<0.05 vs ATZ and CT.

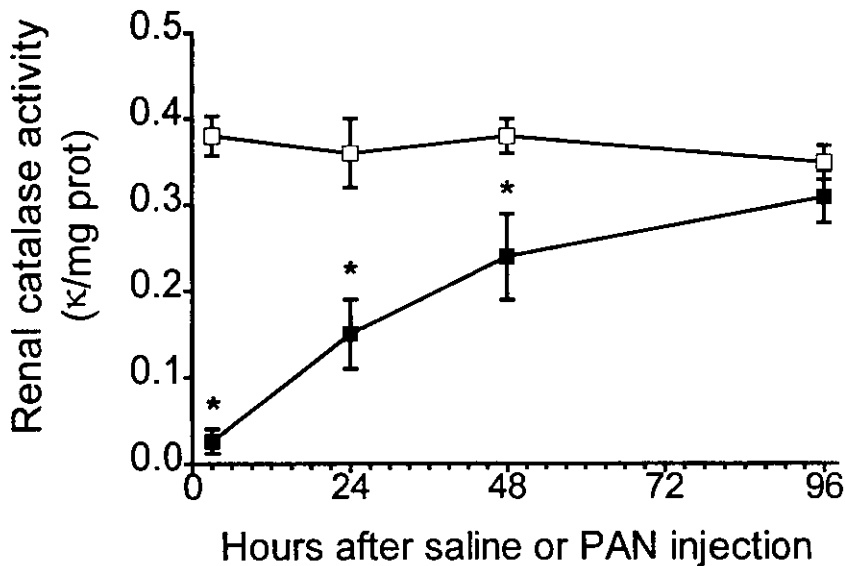


Fig. 1. Time-course of renal catalase activity in control (saline-injected) (□) and ATZ-treated rats (■). ATZ (1 g/Kg) or saline were given at zero time. Catalase was inhibited 93±4% at 3 h, 58±10% at 24 h, 36±13% at 48 h, and 13±8.8 % at 96 h. n=2-5 for control rats and n=4-6 for ATZ-injected rats. Points are mean ± SD. *p<0.001 vs CT.

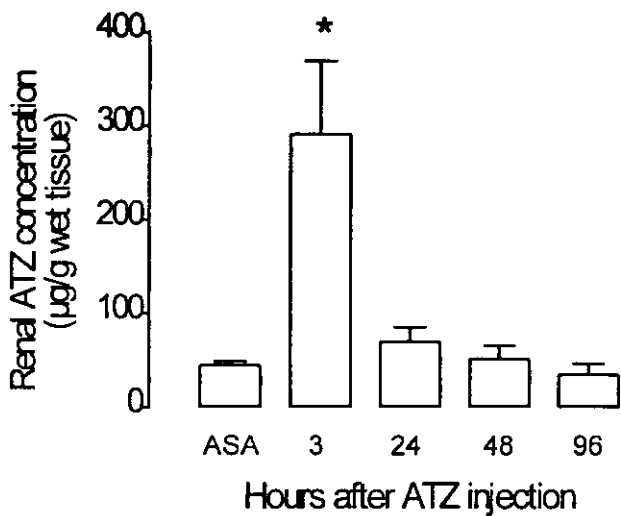


Fig. 2. Aminotriazole (ATZ) content in kidneys of control (basal) and ATZ-treated rats. Bars represent mean \pm SD. $n=6$ for basal and $n=5-6$ for ATZ-injected rats. * $p<0.001$ vs basal value.

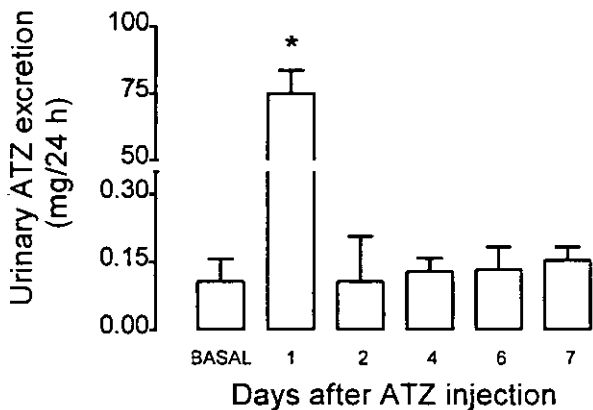


Fig. 3. Urinary excretion of aminotriazole (ATZ). Bars represent mean \pm SD. $n=7$ for basal and ATZ-injected rats. * $p<0.001$ vs basal value.

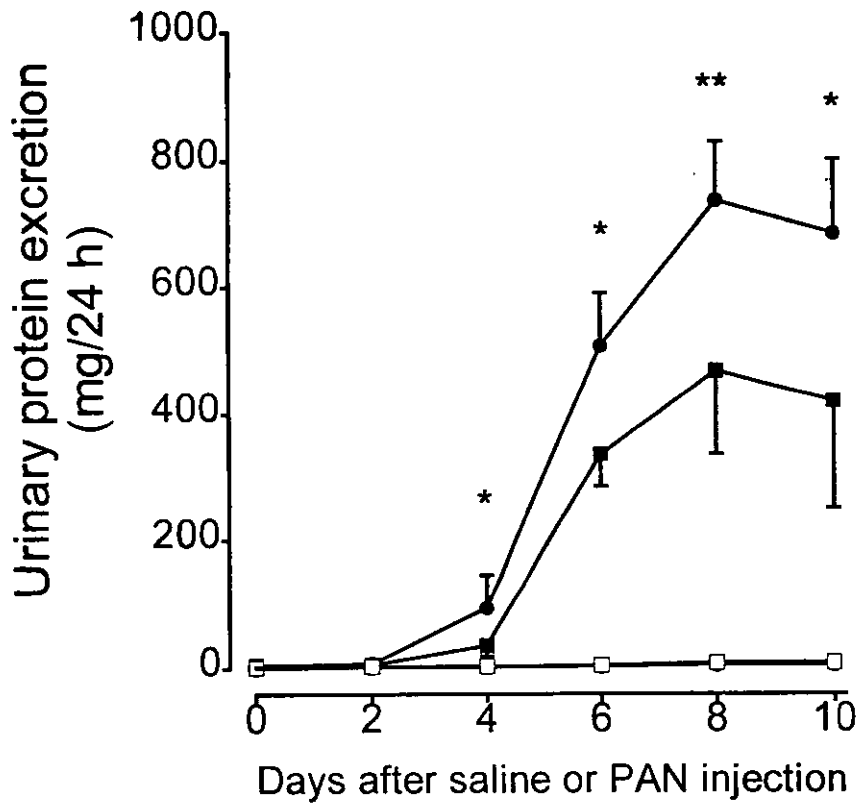


Fig. 4. Time-course of proteinuria in the four groups: control (□), PAN-treated (■), ATZ-treated (○), and ATZPAN-treated rats (●). Open circles are not visible because the ATZ group overlap with the control group. PAN was injected on day 0, ATZ was injected 24 h before PAN. Points are mean \pm SD. $n=7$ for each group. * $p<0.01$ and ** $p<0.001$ vs PAN.



Fig. 5. Representative electron micrographs which showed the glomeruli ultrastructural alterations in PAN and ATZPAN groups. (A) Glomerulus from a rat of the PAN group. There is an area of complete pedicelle fusion (arrows) which alternates with segments in which the swollen pedicelles show individualization (arrows head) (x 6,500). (B) Glomerulus from a rat of the ATZPAN group, which shows capillaries with a complete and diffuse pedicelle fusion (arrow heads). A macrophage with abundant cytoplasmic lipid droplets is in the mesangium (asterisk) (x 4,000).



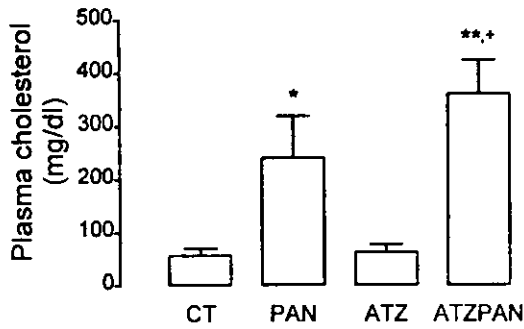


Fig. 6. Plasma cholesterol levels on day 10 in the four groups: CT, control rats; PAN, nephrotic rats; ATZ, aminotriazole-treated rats; ATZPAN, ATZ and PAN-treated rats. Bars are mean \pm SD. $n=7$ for each group. * $p<0.05$ vs CT; ** $p<0.001$ vs ATZ, * $p<0.01$ vs PAN.

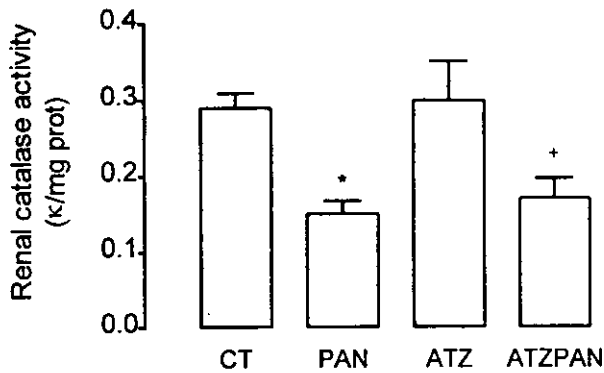


Fig. 7. Renal catalase activity on day 10 in the four groups: CT, control rats; PAN, nephrotic rats; ATZ, aminotriazole-treated rats; ATZPAN, ATZ and PAN-treated rats. Bars are mean \pm SD. $n=7$ for each group. * $p<0.001$ vs CT; * $p<0.001$ vs ATZ.



PHARMACOLOGY LETTERS
Accelerated Communication

GARLIC PREVENTS HYPERTENSION INDUCED BY CHRONIC INHIBITION OF
NITRIC OXIDE SYNTHESIS

José Pedraza-Chaverri¹*, Edilia Tapia², Omar N. Medina-Campos¹, María de los Ángeles Granados¹, and Martha Franco²

¹Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, 04510, México, D. F. ²Department of Nephrology, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", Juan Badiano #1, 14080, México D. F.

(Submitted August 26, 1997; accepted September 29, 1997;
received in final form November 20, 1997)

Abstract. It has been reported that garlic activates nitric oxide synthase *in vitro* and that chronic inhibition of nitric oxide (NO) synthesis by N^ω-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) induces arterial hypertension in rats. In this work, we studied the effect of oral administration of L-NAME for 4 weeks on control and garlic-fed rats. Basal systolic blood pressure was recorded 4 weeks after garlic supplementation, and on weeks 1, 2, 3, and 4 after L-NAME treatment. At the end of the study, the *in vivo* NO production was evaluated indirectly by measuring the urinary excretion of the stable end products of NO metabolism, nitrite (NO₂) and nitrate (NO₃). It was found that L-NAME induced arterial hypertension on weeks 1-4 in control rats but not in garlic-fed rats, whose blood pressure remained essentially as the basal values. Also, during this time period, blood pressure remained unchanged in garlic-fed rats without L-NAME treatment. Urinary excretion of NO₂/NO₃ decreased in L-NAME-treated rats, increased in garlic-fed rats, and remained unchanged in garlic-fed rats treated with L-NAME. It was concluded that garlic blocks the L-NAME-induced hypertension by antagonizing *in vivo* the inhibitory effect of L-NAME on NO production. © 1998 Elsevier Science Inc.

Key Words: garlic, blood, nitrite, nitrate urinary excretion, L-NAME, hypertension

Introduction

Garlic (*Allium sativum* L.) has long been widely used not only as a flavoring but also as a folk medication. The long history of the medicinal use of garlic is well documented: many researchers have reported pharmacological evidence for the use of garlic as anti-microbial (1), anti-thrombotic (2), anti-hypertensive (3,4), anti-hyperglycemic (5), and anti-hyperlipemic (6,7) agent. In addition, garlic has cardioprotective actions in ischemia and reperfusion (8), and activates, in cell free homogenates, nitric oxide (NO) synthase (9-11), the enzyme that produces NO. Since NO plays a

* To whom correspondence should be sent. Facultad de Química, Edificio "B", 2º Piso, Lab 209, Depto. Biología, Ciudad Universitaria UNAM, 04510 México, D.F. México Phone (525)6223515, Fax (525)6162010, E mail: pedraza@servidor.unam.mx

central role in the regulation of blood pressure (12-15), the garlic-induced increase in NO synthase activity, may be related to the anti-hypertensive effect of garlic (3,4). According to the above data, chronic inhibition of NO synthase with the L-arginine analogue N^o-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME), induces arterial hypertension in rats (12,13). Therefore, we made the hypothesis that garlic may stimulate NO synthase *in vivo* and thus, to block the hypertension induced by oral administration of L-NAME in rats. In this work, we studied the effect of oral administration of L-NAME for 4 weeks in control and garlic-fed rats.

Methods

Experimental design. Forty male Wistar rats with an initial body weight of 260-300 grams were used in this work. Twenty rats were fed control diet and twenty rats were fed garlic supplemented diet at 2% (8). After four weeks, basal systolic blood pressure was recorded and it was initiated the oral treatment of L-NAME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in ten rats of each group. L-NAME was dissolved in the drinking water at a concentration of 50 mg/L, resulting in a daily intake of approximately 6 mg/Kg. This resulted in four groups of study of ten rats each one: Control, L-NAME, Garlic, and Garlic+L-NAME. L-NAME was prepared each day and the bottles containing it were protected from the light. Systolic blood pressure was measured in each rat of the four groups on weeks 1, 2, 3, and 4. At the end of the study, rats were put in stainless steel metabolic cages (Allentown Caging Equipment Co., Allentown, NJ, USA) to collect 24-hour urine, in which total protein and the urinary excretion of the stable end products of NO metabolism, nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) were measured. Body weight, and food and water (or L-NAME solution) intake were recorded.

Diet. Rats from Control and L-NAME groups were fed a commercial rat chow (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc., Richmond, TN, USA). Rats from Garlic and Garlic+L-NAME groups were fed a standard chow enriched 2% pulverized dried leaves of garlic (Tone's, Des Moines, IA, USA) for 8 weeks. The standard rat chow consisted of carbohydrate 49%, protein 23.4%, fat 4.5%, and crude fiber 5.3%.

Blood pressure determination. Systolic blood pressure was measured in awake rats by tail cuff method using a programmed electrophygmomanometer and a MK-IV physiograph (Narco Bio Systems, Houston, TX, USA) (16).

Quantitation of NO₂⁻/NO₃⁻. NO is a labile substance with a short half-life and it decomposes rapidly to NO₂⁻ and NO₃⁻ in biological solutions (17), and these stable breakdown products have been measured as an index of NO production (14). NO₂⁻ and NO₃⁻ were measured in both diets and in the 24-hour urine samples at the end of the study (4 weeks after L-NAME treatment). Pellets from both diets (control and 2% garlic) were made powder, and 1 g of this powder was extracted with 10 ml of water overnight with continuous agitation. This extract or urine samples were first incubated with *E. coli* nitrate reductase to convert the NO₃⁻ to NO₂⁻, as described previously (18,19). To prepare this enzyme, *E. coli* were grown for 18 hours under anaerobic conditions in nitrate rich medium, washed, resuspended in phosphate buffer and frozen at -70°C until use. The samples were incubated with the enzyme in phosphate ammonium formate buffer (pH 7.3) for one hour at 37°C. After incubation, total NO₂⁻ in the samples (representing both NO₂⁻ and reduced

NO₃) was measured using the Griess reagent. Known concentrations of NaNO₂ and NaNO₃ were used as standards in each assay.

Total protein in urine. Urinary total protein was precipitated with 10% trichloroacetic acid, washed three times, resuspended in 0.1 M sodium hydroxide and measured according to Lowry *et al.*

Statistical analysis. The data are expressed as the mean±SEM. Data were analyzed by ANOVA and Bonferroni t-test using the software Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). A p value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Body weight, and food and water (or L-NAME solution) intake. There was not significant differences in these parameters among the four groups of rats (data not shown).

Blood pressure determination (Fig. 1). Basal systolic blood pressure, taken after 4 weeks of garlic feeding, was not significantly different among the four groups. Treatment with L-NAME increased significantly systolic blood pressure in control rats, but not in garlic-fed rats. Systolic blood pressure remained essentially unchanged in control and garlic-fed rats.

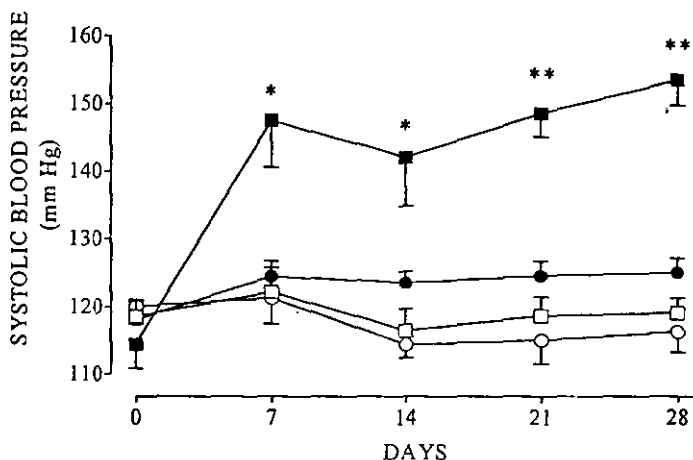


Fig. 1

Time course of systolic blood pressure in the four groups of rats: Control □, L-NAME ■, Garlic ○, and Garlic+L-NAME ●. Points are mean±SEM of 7-10 rats. *p<0.01 and **p<0.001 vs Control and Garlic+L-NAME, respectively. Data on day 0 were obtained after 4 weeks of garlic treatment. L-NAME treatment was started on day 0.

Urinary excretion of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (Fig. 2) and total protein on day 28. Urinary excretion of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ decreased significantly in L-NAME-treated rats, increased significantly in garlic-fed rats and remained unchanged in garlic fed-rats treated with L-NAME. Urinary excretion of total protein was not statistically different among the four groups (22 ± 2.6 , 25 ± 2.3 , 19.5 ± 3.2 , 18.8 ± 2.6 mg/24 h, for Control, L-NAME, Garlic and Garlic + L-NAME groups, respectively; $p > 0.05$).

$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ content in both diets. The content of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ in both diets was not statistically different (825 ± 46 and 826 ± 42 nmoles/g for control and 2% garlic enriched diet, respectively; $p > 0.05$).

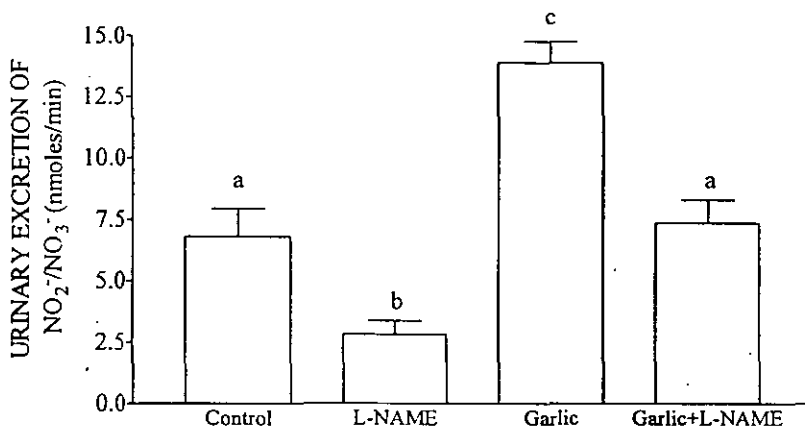


Fig. 2

Urinary excretion of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ in the four groups of rats at the end of the L-NAME treatment. Values are mean \pm SEM of 7-10 rats. Values with different letter superscripts are significantly different: $c > a > b$.

Reversion of L-NAME-induced hypertension by garlic (Fig. 3). In a separate group of ten rats, we investigated whether garlic had the ability to revert the L-NAME-induced hypertension. Rats were fed with control diet without garlic, basal systolic blood pressure was recorded (day 0) and then, the oral treatment of L-NAME was started as described above. Systolic blood pressure was recorded on days 7 and 14. On day 14, rats were divided in two groups, both of which were drinking L-NAME solution: (1) three rats were maintained with control diet, and, (2) in the other seven rats, the diet was changed from control to 2% garlic. Systolic blood pressure was recorded on days 21 and 28 in these two groups of rats. The results are shown in Fig. 3. L-NAME induced hypertension on days 7, 14, 21 and 28 in rats fed with control diet. When the diet was changed to 2% garlic on day 14 in seven rats, the systolic blood pressure decreased on days 21 and 28, but still was significantly higher than basal systolic blood pressure obtained on day 0.

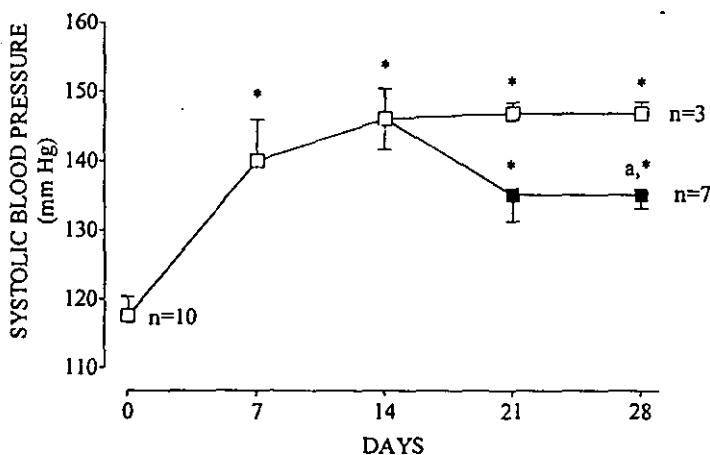


Fig. 3.

Effect of garlic on L-NAME-induced hypertension: L-NAME □, L-NAME+Garlic ■. Points are mean±SEM. * = $p < 0.05$ vs. basal value (day 0), a = $p < 0.01$ vs. L-NAME group on day 28. Garlic treatment was started on day 14. Statistical analyses were made by ANOVA and Dunnett test and by unpaired t test.

Discussion

NO is a potent vasodilating factor that imparts a continuous dilator tone in the maintenance of systemic blood pressure (15). NO is produced in many tissues by a family of NO synthases, which transform L-arginine into NO and citrulline, with 1:1 stoichiometry (14). NO synthase can exist in either a constitutive (calcium-dependent) or an inducible (calcium-independent) form (14). The formation of NO by either enzyme can be inhibited by L-arginine analogues such as L-NAME. Therefore, the chronic inhibition of NO synthesis, by the oral administration of L-NAME, induces arterial hypertension (12,13). In this work, the effect of L-NAME on blood pressure was blocked in garlic-fed rats. This may be explained, at least in part, by the *in vivo* effect of garlic on NO production. Garlic increased the urinary excretion of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (Garlic group) and prevented the decrease in the urinary excretion of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ induced by L-NAME (Garlic+L-NAME group), which strongly suggest that garlic increases NO synthase *in vivo*. The alterations in the urinary excretion of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ were not due to changes in food intake or to the higher $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ content of 2% garlic enriched diet. To our knowledge, this is the first demonstration that garlic increases NO synthase *in vivo*. Additional studies are required to establish if garlic activates constitutive or inducible isoform of NO synthase. Our data support the previous findings of Das *et al.* (9-11), who measured the NO synthase activity directly *in vitro*.

In addition, it has been found that garlic inhibits the activity of angiotensin I converting enzyme (8) which catalyzes the conversion of angiotensin I to angiotensin II. Angiotensin II is a potent vasoconstrictor that has been involved in the L-NAME-induced hypertension (13). Therefore, in addition to the activation of NO synthase, the inhibition of angiotensin I converting enzyme by garlic, also could be involved in the anti-hypertensive effect of garlic in our L-NAME treated rats. However, it will be necessary to measure the activity of angiotensin I converting enzyme in similar groups of rats to support this hypothesis. The activation of NO synthase and the inhibition of angiotensin I converting enzyme by garlic, may be involved in the anti-hypertensive action of garlic observed in patients (3) and rats (4) with high blood pressure.

We were unable to demonstrate renal damage (assessed by proteinuria) in L-NAME-treated rats on day 28. This may be due to the time of treatment with L-NAME. It is possible that longer time period of L-NAME treatment, could produce proteinuria in our rats.

In the additional experiment performed, it was showed that garlic reverted partially the established hypertension induced by L-NAME solution. This observation suggests that garlic could revert, at least partially, the established hypertension in humans and in other experimental models.

Several components of garlic such as allicin, alliin, and ajoene are known (20), but the individual compound(s) responsible(s) for the activation of NO synthase have yet to be established. Das *et al.* (10) have been found that neither L-arginine, nor alliin-derived products are responsible for the activation of NO synthase by garlic in cell-free homogenates. Additional research is required to address this point.

The effect of garlic on L-NAME induced hypertension warrants further investigation in clinical and experimental arterial hypertension.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants of DGAPA and Facultad de Química (UNAM): IN203797 and PAIP6190-03, respectively.

References

1. L. CELLINI, E. DI CAMPLI, M. MASULLI, S. DI BARTOLOMEO and N. ALLOCATI, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13** 273-277 (1996).
2. T. BORDIA, N. MOHAMMED, M. THOMSON and M. ALI, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **54** 183-186 (1996).
3. F.G. MCMAHON and R. VARGAS, *Pharmacotherapy.* **13** 406-407 (1993).
4. D.B. FOUSHEE, J. RUFFIN and U. BANERJEE, *Cytobios.* **34** 145-152 (1982).
5. M.L.W. CHANG and M.A. JOHNSON, *J. Nutr.* **110** 931-936 (1980).
6. Y.Y. YEH and S.M. YEH, *Lipids.* **29** 189-193 (1994).

7. S. EILAT, Y. OESTRAICHER, A. RABINKOV, D. OHAD, D. MIRELMAN, A. BATTLER, M. ELДАР and Z. VERED, *Coronary Artery Disease*. 6 985-990 (1995).
8. B. RIETZ, H. ISENSEE, H. STROBACH, S. MAKDESSI and R. JACOB, *Mol. Cell. Biochem.* 119 143-150 (1993).
9. I. DAS, N.S. KHAN and S.R. SOORANNA, *Biochem. Soc. Trans.* 23 136S (1995).
10. I. DAS, J. HIRANI and S. SOORANNA, *J. Ethnopharmacol.* 53 5-9 (1996).
11. I. DAS, N.S. KHAN and S.R. SOORANNA, *Curr. Med. Res. Opin.* 13 257-263 (1995).
12. M.O. RIBEIRO, E. ANTUNES, G. DE NUCCI, S.M. LOVISOLO and R. ZATZ, *Hypertension*. 20 298-303 (1992).
13. M.G. MELARAGNO and G.D. FINK, *Am. J. Physiol.* 271 H806-H811 (1996).
14. S. MONCADA, R.M.J. PALMER and E.A. HIGGS, *Pharmacol. Rev.* 43 109-142 (1991).
15. D.D. REES, R.M.J. PALMER and S. MONCADA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86 3375-3378 (1989).
16. E. TAPIA, F. GABBAI, C. CALLEJA, M. FRANCO, J.L. CERMEÑO, N.A. BOBADILLA, J.M. PÉREZ, J.A. ALVARADO and J. HERRERA-ACOSTA, *Kidney Int.* 38 642-648 (1990).
17. M.A. MARLETTA, P.S. YOON, R. LYENGAR, C.D. LEAF and J.S. WISHNOK, *Biochemistry*. 27 8706-8711 (1988).
18. B. BARTHOLOMEW, *Food Chem. Toxicol.* 22 541-543 (1984).
19. D.L. GRANGER, J.B. HIBBS Jr, J.R. PERFECT and D.T. DURACK, *J. Clin. Invest.* 85 264-273 (1990).
20. E. BLOCK, *Sci. Am.* 252 114-119 (1985).

VII. RESUMEN DE RESULTADOS

Modelo de nefrotoxicidad por aminonucleósido de puomicina

1. La dieta con ajo en polvo al 2% disminuyó la cantidad de H_2O_2 *in vivo*, en ratas controles, lo que puede considerarse como una evidencia de que el ajo en polvo posee capacidad antioxidante.
2. Esta dieta provocó una disminución en la actividad renal de CAT en ratas control, e impidió la disminución de SOD total en los animales nefróticos alimentados con ajo en polvo. Esta dieta no modificó las actividades renales y plasmáticas de GSH-Px en los animales controles y en los nefróticos.
3. Se demostró que existe un incremento significativo de H_2O_2 *in vivo* 10 días después de la inyección de ANP en los grupos SN y SNA. Este incremento no fue bloqueado en las ratas alimentadas con ajo en polvo.
4. La dieta suplementada con ajo en polvo al 2% no tuvo efecto protector sobre la proteinuria y los parámetros bioquímicos en el SN inducido por ANP.
5. La inhibición de CAT por ATZ, 24 h antes de la inyección de ANP, exacerbó el daño incrementando la proteinuria y la hipercolesterolemia.

Modelo de hipertensión inducido por L-NAME

1. Una dieta con ajo en polvo al 2 % bloqueó la hipertensión inducida L-NAME y revirtió parcialmente el efecto del L-NAME en ratas alimentadas con dieta estándar.
2. Esta dieta aumentó la excreción urinaria de nitritos y nitratos e impidió la disminución de la excreción de éstos en los animales tratados con L-NAME+AJO.

VIII. DISCUSION

Modelo de SN inducido por ANP

Las ERO pueden actuar directamente sobre moléculas biológicas como las proteínas, oxidándolas o nitrándolas produciendo carbonilos oxidados y 3-nitro-L-tirosina, respectivamente (140); sobre lípidos, generando productos de lipoperoxidación como malondialdehído o 4-hidroxi-2-nonenal (141,142); y sobre el ADN o el ARN, produciendo 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y 8-hidroxi-guanosina, respectivamente (143). Estos compuestos generados son productos de la reacción entre las macromoléculas biológicas y las ERO, y se han usado ampliamente como marcadores de estrés oxidativo. Por otra parte, la detección *in vivo* de las ERO, como consecuencia de la administración de ciertas drogas que provocan estrés oxidativo, puede dar un índice del estrés oxidativo experimentado (132,144-146).

En el modelo de SN por ANP, se evaluó el estrés oxidativo a través de los productos de lipoperoxidación por TBARS y se midió la cantidad renal de H_2O_2 *in vivo*. El estrés oxidativo no se pudo hacer evidente mediante la lipoperoxidación. Esto pudo deberse a variaciones en la técnica que han sido observadas por otros autores (141,147). Sin embargo, no conocemos si otros factores, como la composición de la dieta, pueden influir en nuestros resultados, ya que se ha demostrado que la alimentación con una dieta suplementada con vitamina E, previene el aumento de lipoperoxidación renal pero no la proteinuria inducida por ANP (63,66).

Los resultados de la cantidad renal de H_2O_2 *in vivo* 10 días después de la inyección de ANP, indican que existe una mayor cantidad de H_2O_2 en los grupos SN y SNA, en comparación con sus respectivos controles. Esto sugiere que el daño provocado por el ANP es, en parte, originado por un aumento de estrés oxidativo en estos grupos. Por otra parte, los datos obtenidos de estas determinaciones, indican que la dieta con ajo en polvo no tuvo ningún efecto sobre la cantidad renal de H_2O_2 *in vivo*, en los animales nefróticos, y esto puede explicar de alguna manera los resultados obtenidos en la proteinuria, debido a que ésta tuvo un curso temporal muy parecido en los grupos SN y SNA. Gwinner *et al.* (59), evaluaron a diferentes tiempos la participación de las ERO en este modelo usando técnicas de quimioluminiscencia. Ellos encontraron que el H_2O_2 se incrementa durante los primeros 15 min después de la inyección de ANP; 9 días después de esta inyección se siguen generando ERO, sin embargo, en este tiempo la mayor participación parece deberse al anión superóxido. La técnica utilizada en este trabajo para medir la cantidad de H_2O_2 *in vivo*, no permite hacer la determinación a tiempos menores de una h posteriores a la inyección de ANP. Además, debido a que no se había estudiado el papel *in vivo* del H_2O_2 , nosotros inhibimos a la CAT con ATZ antes de inyectar ANP. De esta manera podríamos saber si hay un aumento en la concentración de H_2O_2 en las primeras h posteriores a la inyección de ANP y con esto, estrés oxidativo, y si el H_2O_2

generado es un factor importante para causar daño al glomérulo. El ATZ inhibe de manera específica e irreversible a la CAT sólo en presencia de H_2O_2 (133,137) y la recuperación de su actividad *in vivo* se debe exclusivamente a la síntesis de *ново* de la proteína (37,138). El curso temporal de la recuperación de la actividad de CAT, así como la eliminación del ATZ observada por nosotros, es semejante a la que han reportado otros autores (133,139). El aumento en la hipoproteinemia, hipercolesterolemia y proteinuria que encontramos en el grupo ATZANP, apoya la hipótesis de que en este modelo hay estrés oxidativo y que el H_2O_2 está involucrado en la patogénesis del SN por ANP dentro de los primeros cuatro días posteriores a la administración de ANP, tiempo en el cual el ATZ es eliminado en su totalidad. No obstante nuestros resultados, no podemos descartar que las otras ERO estén participando también activamente en el daño por el ANP.

Se encontró disminución en las actividades de las enzimas renales CAT y SOD total en los animales del grupo SN, esta última debido a disminución sólo en la fracción CuZn-SOD, pero no hubo cambios en la actividad renal y plasmática de GSH-Px. Bhuyan *et al.* (148), Hattori *et al.* (149), Wang *et al.* (150), y Gwinner *et al.* (59), encontraron que la actividad renal de CAT disminuye en ratas con SN por ANP. Este último investigador, además de actividad, evaluó los niveles de ARNm de CAT y cantidad de esta enzima. Encontró una disminución en la cantidad de proteína, pero no en la de ARNm, lo que sugiere una regulación postranscripcional de CAT en este modelo, como por ejemplo un aumento en su degradación o una disminución en su síntesis. Kono *et al.* (151) evaluaron los posibles efectos del anión superóxido sobre la actividad de CAT y encontraron que esta enzima es susceptible de ser inactivada por este anión al formar compuestos II y III de CAT, dos formas inactivas de esta enzima y que la acumulación de estas puede estar asociada con su inactividad. Esta puede ser una segunda probable explicación de la baja actividad de CAT en este modelo, si es que se están produciendo más aniones superóxido en las ratas nefróticas que en las controles. Sin embargo, los cambios en la actividad de SOD informados en la literatura no son homogéneos, ya que algunos autores encuentran que su actividad se incrementa en el día 10 después de la inyección de ANP (60), otros que baja en un 55 y 27% (149,150) y otros que permanece igual (59). Se ha informado que la CuZn-SOD pero no la MnSOD puede ser inactivada por H_2O_2 (152). Se encontró una disminución en CuZn-SOD y niveles más altos de H_2O_2 en las ratas con ANP, lo que probablemente explicaría esta disminución. Se ha informado que la actividad renal de GSH-Px aumenta en el día 2 (61) que disminuye en los días 9 y 10 (59,149) o permanece sin cambio en el día 10 (60). El cuadro 5 resume los hallazgos encontrados por diversos investigadores sobre las enzimas antioxidantes en este modelo.

Cuadro 5. Actividad renal y glomerular de enzimas antioxidantes en el SN por ANP

Autor	Catalasa	GSH-Px	SOD total	Mn-SOD
Bhuyan (1980) día 10 <i>in vivo</i> (148)	↓	ND	ND	ND
Kawamura (1991) día 10 <i>in vivo</i> (60)	↓ 35%	=	↑ 38%	=
Wang (1993) día 20 <i>in vivo</i> (150)	↓ 23%	ND	↓ 55%	ND
Hattori (1991) día 10 <i>in vivo</i> (149)	↓ 28%	↓ 25%	↓ 27%	ND
Arévalo (1994) día 2 <i>in vivo</i> (61)	ND	↑ 240%	ND	ND
Gwinner (1997) día 1, 5 y 9 <i>in vivo</i> (59)	↓25% sólo en el día 9	↓23% sólo en el día 9	=	=
Granados (1999) día 10 <i>in vivo</i>	↓81%	=	↓31%	=

No hay estudios en los cuales se hayan evaluado las actividades de las enzimas antioxidantes extracelulares en este modelo, por lo que nosotros medimos la actividad de pGSH-Px, debido a que es una de las principales defensas fisiológicas en contra de las ERO liberadas al espacio extracelular (29). La pGSH-Px es la responsable de toda la actividad de peroxidasa en plasma (153), nosotros no encontramos cambio en la actividad de esta enzima, ni en el grupo CTA ni en los grupos nefróticos. Se conoce que esta isomorfa de GSH-Px se sintetiza en riñón, particularmente en el túbulo proximal (28,154) y que disminuye en pacientes con insuficiencia renal (29). El modelo de SN por ANP es un modelo de daño glomerular, por lo que no anticipábamos que cambiara la actividad de pGSH-Px. En nuestro laboratorio se ha observado que esta isomorfa disminuye en la nefrotoxicidad por gentamicina, que se caracteriza por necrosis de las células del túbulo proximal.

A pesar de las evidencias *in vivo* (98,109,123,124) e *in vitro* (100,114-122) de las propiedades antioxidantes del ajo en polvo, no observamos ningún efecto protector de una dieta con ajo en polvo sobre el SN inducido por ANP, ya que los resultados sobre proteinuria y los parámetros bioquímicos que caracterizan este síndrome, en contra de lo esperado, no cambiaron en los animales nefróticos. Nosotros empleamos para la elaboración de la dieta, ajo en polvo con el fin de proporcionarle el ajo a la rata de una manera más natural, y además que no queríamos eliminar ninguna sustancia del ajo en polvo que pudiera resultar benéfica en este modelo, todo esto debido a que en los otros estudios *in vivo* donde se ha observado el efecto protector del ajo en polvo contra las ERO, se emplean extractos envejecidos de ajo administrados por vía intravenosa (98,109,123). Por otra parte en los experimentos *in vitro* en donde el ajo puede modular las actividades de las enzimas antioxidantes incrementando su actividad (121,122), éste se ha adicionado a los cultivos de células en forma de extracto de ajo envejecido. Cabe hacer notar que de tres extractos diferentes de ajo (extracción acuosa, extracción acuosa en caliente y extracto de ajo envejecido), sólo el extracto que contenía S-

alicisteina y S-alilmercaptocisteína (el extracto de ajo envejecido) presentó un efecto antioxidante, disminuyendo la lipoperoxidación microsomal hepática (115). Aunque se ha probado la estabilidad térmica del ajo (100), nosotros no hemos caracterizado cual de los compuestos organosulfurados está presente en mayor proporción en el ajo en polvo y tal vez los que posean actividad antioxidante no estén en suficiente cantidad para aminorar el daño por ANP. Este puede ser un probable factor por el cual nosotros no observamos algún efecto protector. Por otra parte no hay que perder de vista que los estudios *in vivo* son mucho más complejos de controlar, dado que existen muchas variables que no son posibles de manipular como en los experimentos *in vitro*, donde se trabajan sistemas aislados en los cuales la sustancia a probar puede llegar de manera directa. En nuestras condiciones sería necesario evaluar la distribución en el riñón de los compuestos organosulfurados del ajo, y conocer si éstos no están experimentando modificaciones químicas durante su digestión, en el estómago y el intestino.

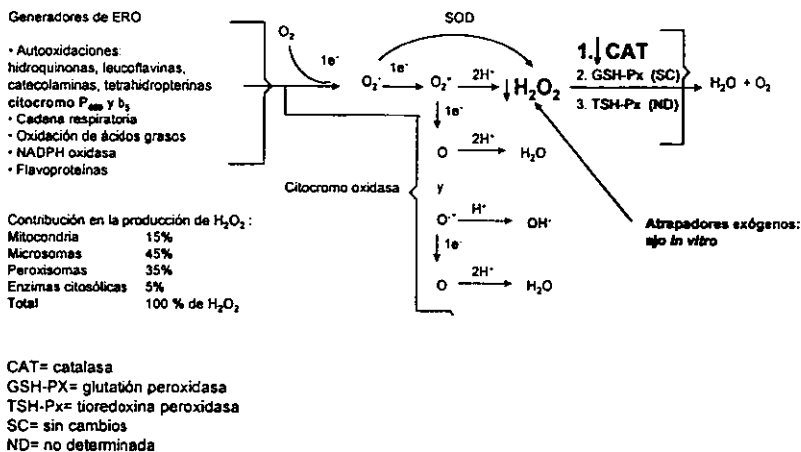
Dos hallazgos muy interesantes en este trabajo, son que la dieta con ajo en polvo previene la disminución de la actividad de CuZn-SOD en el grupo SNA y que la actividad de CAT en el grupo CTA es significativamente menor que en el grupo CT. No obstante la prevención en la disminución de CuZn-SOD por la dieta con ajo en polvo, no se observó efecto protector en el grupo SNA.

Khanum *et al.* (155) encontraron que la actividad de CAT hepática disminuyó en las ratas alimentadas con una dieta de ajo fresco y aceite de ajo, sin embargo en ese trabajo no se exploró cual podría ser la posible explicación a este fenómeno y el origen de esa disminución.

Nosotros evaluamos la cantidad de H_2O_2 *in vivo* en grupos controles con ambas dietas, el H_2O_2 disminuyó en el grupo CTA. Estos resultados sobre la cantidad de H_2O_2 *in vivo*, nos indican que el ajo en polvo si tiene actividad antioxidante, pero que ésta no pudo hacerse evidente en este modelo debido a que tal vez la producción de ERO en los primeros minutos, posteriores a la inyección de ANP, supera la capacidad antioxidante del ajo en polvo y de las mismas defensas antioxidantes endógenas, produciéndose el daño a la membrana basal glomerular por ERO.

El efecto sobre la cantidad de H_2O_2 también lo observó Wei *et al.* (121) en células del endotelio vascular, tratadas con extractos de ajo, sólo que en este caso los autores postularon que se debía a la mayor actividad de CAT en estas células. Además se conoce que los extractos envejecidos de ajo pueden actuar como atrapadores de H_2O_2 (119) lo cual puede conducir a la disminución del estrés oxidativo, por lo que se puede especular que finalmente esto conduzca a la disminución en la actividad de CAT. La disminución en la actividad de CAT observada en ratas alimentadas con una dieta con restricción calórica es consecuencia de una menor síntesis de esta proteína y se ha postulado, que esto se debe a una menor generación de ERO en estos animales (156). Los hallazgos encontrados por Wei *et al.* (121) están parcialmente de acuerdo con nuestros hallazgos, en cuanto a que el ajo disminuye la cantidad de H_2O_2 . Sin embargo ellos encuentran que la actividad de CAT

aumenta en las células del endotelio vascular y nosotros encontramos que la actividad de CAT disminuye no solamente en tejido renal sino también en hígado (datos no mostrados) en ratas alimentadas con ajo en polvo. Esto nos lleva a buscar cual es la probable explicación a la disminución en la actividad de CAT en estas ratas y si esto pudiera estar asociado a la disminución en los niveles de H_2O_2 *in vivo*; por lo que en nuestro laboratorio en la actualidad, se están llevando a cabo estudios para establecer cual es la razón por la que disminuye la actividad de CAT en los animales alimentados con una dieta con ajo en polvo. Uno de estos estudios es el análisis de la síntesis y degradación de CAT en ratas alimentadas con ambas dietas. Los resultados que se tienen hasta el momento, indican que en las ratas alimentadas con ajo en polvo, disminuye la síntesis de esta enzima en alrededor de un 60% en riñón y en un 67% en hígado, esta puede ser una de las razones por las cuales la actividad de CAT disminuye en las ratas alimentadas con una dieta suplementada con ajo en polvo. No obstante no podemos descartar que esta disminución se deba también a otros cambios durante la síntesis de CAT. Por otra parte, también falta investigar cual es el significado biológico de esta disminución.



Esquema 9. Fuentes de ERO y mecanismos de detoxificación. Probable papel de los principios activos del polvo de ajo.

Como se mencionó con anterioridad, nosotros observamos un efecto final del polvo de ajo en las ratas control: la cantidad de H_2O_2 y la actividad de CAT disminuyeron. Con este trabajo no podemos saber cual es la causa-efecto de este fenómeno, sin embargo se puede especular que la disminución de la poza de H_2O_2 inducida por el ajo en polvo, pudiera deberse a la interferencia con algunos de los sistemas generadores de ERO (Esquema 9). Por otra parte, también puede actuar como atrapador

del H_2O_2 como se ha descrito en otros trabajos (119) o puede modificar los otros sistemas enzimáticos detoxificadores del H_2O_2 además de la CAT (Esquema 9). En este trabajo se evaluó la actividad de GSH-Px, pero no la del sistema tioredoxina peroxidasa. Los efectos del polvo de ajo en estos sistemas puede ser motivo de búsqueda en investigaciones posteriores.

La regulación de CAT se ha explorado durante el estrés oxidativo. Algunos investigadores han encontrado que su ARNm y/o actividad disminuyen (157-159) o aumentan (160-163) cuando el animal es sometido a estrés oxidativo. Esto no significa, que estos dos parámetros deban tener el mismo comportamiento, ya que esta enzima puede regularse a nivel de transcripción (162), estabilidad del ARNm (160,164), y a nivel de síntesis y degradación de la proteína (156,165,166). Por otra parte, la actividad de CAT se induce también por agentes proliferantes de peroxisomas como el di(2-etilexil)ftalato (167) y se suprime en procesos tumorales (168).

La regulación de las enzimas antioxidantes es motivo en la actualidad de gran estudio. Se sabe que la Mn-SOD puede ser modulada por varios estímulos entre los que se incluyen las ERO y quelantes de hierro (25,26). El H_2O_2 adicionado a cultivos de células mesangiales renales aumenta la actividad de Mn-SOD pero no la de CuZn-SOD (26).

En el pulmón de rata, la síntesis de CuZn-SOD se incrementa de manera espontánea en el estadio fetal (169). Cuando se expone a concentraciones de oxígeno > 95% en ratas adultas y neonatas se observa el mismo fenómeno (169). En estudios experimentales se encontró que bajo condiciones normales de gestación y postgestación esta enzima se regula a nivel transcripcional, de la misma manera se regula cuando las ratas neonatas se someten a condiciones de hiperoxia. En ratas adultas se observa que la regulación es traduccional y al ser sometidas a un segundo período de hiperoxia la regulación es transcripcional (169). Esto indica que el estadio de desarrollo, la tensión de oxígeno y la cantidad de estímulos, son factores que regulan la actividad de CuZn-SOD en el pulmón de rata. Por otra parte, otros órganos no muestran el mismo comportamiento en condiciones de hiperoxia; las actividades en el corazón no cambian y disminuyen en el caso del hígado y el riñón (170). Además, en condiciones fisiológicas no existe una correlación entre los niveles de ARNm de CuZn-SOD y la tensión de oxígeno por lo que se cree que otros factores, además de éste, regulan la expresión del gen de CuZn-SOD (170). En tejidos de rata normales, los niveles de ARNm de Cu-ZnSOD se encuentran en este orden: hígado>riñón>cerebro>cerebelo>pulmón, el orden en cuanto a actividad enzimática es similar al encontrado en sus ARNm, lo que sugiere que el control de las actividades de éstas enzimas reside en gran parte en la regulación de sus niveles de ARNm (22,170). En el caso de Mn-SOD, existe también un incremento de ARNm en pulmón de rata, cuando estas son colocadas en una atmósfera con una concentración de 85% de O_2 , este incremento se debe, en parte, a la activación transcripcional del gen de Mn-SOD en la rata durante los estímulos hiperóxicos (20). Por otra parte, estímulos por lípolisacáridos, interleucina-1, interleucina-6, $TNF\alpha$ y glucocorticoides no

modifican los niveles de ARNm de CuZn-SOD pero si los de Mn-SOD (22,171,172). La síntesis de CuZn-SOD y de Mn-SOD, se regula principalmente por las concentraciones celulares del ion superóxido como respuesta a un estrés oxidativo (20,173).

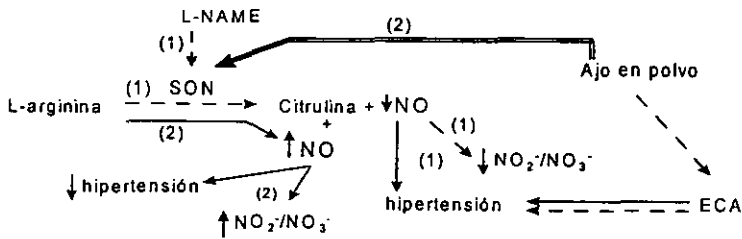
Las células renales, de igual manera que los otros tejidos, responden a estímulos biológicos entre los que se incluyen las ERO con el incremento de las actividades de algunas enzimas antioxidantes. Las células mesangiales de rata en cultivo, incubadas con H_2O_2 , muestran una mayor actividad de Mn-SOD que las células no tratadas, mientras que la actividad de CuZn-SOD no se altera. Los resultados de este experimento sugieren que este incremento de Mn-SOD es consecuencia de un aumento en la transcripción (26). El ANP (25 a 50 $\mu g/ml$) aumentó la transcripción de Mn-SOD de 2 a 5 veces más en cultivos de células endoteliales en comparación con las células control (174). Así mismo el H_2O_2 y la β -naftoflavona indujeron un incremento en la transcripción de este gen (174). Por otra parte, los glomérulos aislados de ratas, sometidas a isquemia seguida de reperfusión, presentaron actividades elevadas de las enzimas antioxidantes (161). De manera semejante que en el pulmón, los glucocorticoides pueden aumentar la actividad de estas enzimas en el riñón (26).

La regulación de la GSH-Px, por las concentraciones de selenio presentes en la dieta, es un ejemplo de la regulación de las enzimas según la disponibilidad de sus cofactores. En la deficiencia progresiva de selenio se observa que la actividad de esta enzima, disminuye de manera paulatina, sin embargo, su ARNm sigue expresándose, por lo que se piensa que la transcripción del gen de GSH-Px no se afecta en la deficiencia de selenio y que la disminución en su actividad se debe, a que no es posible incorporar, al sitio activo de la enzima, la seleno-cisteína (175).

Modelo de hipertensión.

El ON es un potente vasodilatador que se sintetiza continuamente a partir de la L-arginina por la SON. Esta enzima tiene tres isomorfos, dos de las cuales son reguladas por los niveles intracelulares de Ca^{2+} (85,86). La síntesis de ON puede inhibirse por L-NAME, un análogo de L-arginina. La administración crónica de L-NAME produce hipertensión arterial en animales (90). El objetivo de esta parte del trabajo, fue observar si una dieta suplementada con ajo en polvo podía bloquear el efecto hipertensor del L-NAME en ratas. Existen evidencias de que el extracto etanólico del polvo de ajo aumenta los niveles de NO_2^-/NO_3^- y la actividad de la SON dependiente de Ca^{2+} , en dos sistemas *in vitro* (111-113). En este trabajo se encontró que los niveles urinarios de NO_2^-/NO_3^- en ratas alimentadas con ajo en polvo al 2% (CTA) son significativamente más altos que en las ratas alimentadas con dieta estándar. El aumento en los niveles urinarios de NO_2^-/NO_3^- puede explicar en parte, el porque las ratas tratadas con L-NAME y con una dieta suplementada con ajo en polvo

(CTA+L-NAME) no desarrollaron hipertensión, es decir, la dieta con ajo en polvo aumentó los niveles de ON en estos animales y su efecto vasodilatador se refleja en el bloqueo del efecto hipertensor del L-NAME, lo cual apoya nuestra hipótesis. Sin embargo, para poder aseverar definitivamente que la dieta con polvo de ajo aumenta la actividad de la SON, sería necesario medir su actividad en algún tejido involucrado directamente con la producción de ON (por ejemplo en el endotelio) y/o algún producto de la activación de las enzimas involucradas en la relajación del músculo liso (por ejemplo el GMPc). Por otra parte, no se puede perder de vista, que se ha documentado que extractos acuosos de ajo pueden inhibir a la enzima ECA (109,110), y que este puede ser un factor adicional que contribuya a disminuir la presión en animales tratados con L-NAME y alimentados con una dieta con ajo en polvo. Un hallazgo adicional de este trabajo fue, el que la dieta con ajo en polvo, revierte parcialmente el efecto hipertensor del L-NAME.



SON= Sintasa de óxido nítrico
 NO= Oxido nítrico
 ECA= Enzima convertidora de angiotensina
 (1) - - - = inhibición
 (2) → = activación

Esquema 10. Posibles sitios de acción del ajo en polvo sobre la hipertensión inducida por L-NAME.

El esquema 10 describe los posibles sitios de interacción en donde los principios activos del ajo en polvo, pueden estar modificando el efecto hipertensor del L-NAME. Como ya se mencionó con anterioridad, el aumento en la excreción de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ en el grupo CTA nos conduce a pensar que el ajo en polvo activa a la SON, y que esto bloquea el efecto hipertensor del L-NAME en las ratas CTA+L-NAME. Por otra parte, el ajo en polvo puede estar también interfiriendo con otros sistemas

reguladores de la presión arterial como es el caso del sistema renina-angiotensina inhibiendo a la ECA. Otra posibilidad es que el ajo en polvo interfiera directamente con el L-NAME en este trabajo no se evaluó esta posibilidad. Sin embargo, los trabajos *in vitro* que se han llevado a cabo con este inhibidor, no indican tampoco que los extractos de ajo utilizados por ellos, puedan reaccionar directamente con el L-NAME (111-113).

En este trabajo observamos dos efectos del ajo en polvo, por una parte, ningún efecto protector sobre el SN y por otra, un efecto protector sobre la hipertensión arterial. Los resultados que obtuvimos no son necesariamente opuestos debido a que cada una de estas patologías tiene un origen diferente, y por lo tanto, las sustancias con actividad farmacológica para cada una de estas enfermedades, que están presentes en el polvo de ajo, pueden estar en diferentes proporciones, de tal manera que para una puedan ser suficientes y para la otra no. En ambos modelos es necesario explorar los principios activos del ajo en su forma más pura posible y a través de una vía más directa a los órganos blanco afectados, minimizando con ello, que estos principios activos puedan tener modificaciones posteriores a su ingesta por vía oral.

IX. CONCLUSIONES

Modelo de nefrotoxicidad por aminonucleósido de puromicina

1. No obstante, que se demostró que el ajo en polvo disminuye los niveles renales de H_2O_2 *in vivo* en ratas control, y que existe un aumento en los niveles renales de H_2O_2 *in vivo* en el SN por ANP, la dieta con ajo en polvo no fue capaz de disminuir el daño renal en este modelo.
2. El H_2O_2 tiene un papel relevante en la patogénesis del SN por ANP, ya que la inhibición de CAT por ATZ 24 h antes de la inyección de ANP, exacerbó el daño incrementando la proteinuria y la hipercolesterolemia.

Modelo de hipertensión inducido por L-NAME

3. La prevención de la hipertensión y la disminución de ésta, en el modelo de hipertensión inducido por L-NAME, se atribuye, a que el ajo en polvo induce la activación de la sintasa del óxido nítrico, una de las enzimas importantes en la regulación de la presión arterial, ya que esta dieta aumentó la excreción urinaria de nitratos y nitritos, productos estables que son medidos como un índice de la producción de óxido nítrico, e impidió la disminución de la excreción de éstos, en los animales tratados con AJO+L-NAME.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991;91(Suppl 3C):2S-13S.
2. Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993;69:261-274.
3. Birtwistle RJ, Michael J, Howie AJ, Adu D. Reactive oxygen products in heterologous anti-glomerular basement membrane nephritis in rats. *Br J Exp Pathol* 1989;70:207-213.
4. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG, Ward PA. Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest* 1984;51:396-403.
5. Kawaguchi M, Yamada M, Wada H, Okigaki T. Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury *in vitro* caused by puromycin aminonucleoside. *Toxicology* 1992;72:329-340.
6. Trachtman H, Del Pizzo R, Futterweit S, Levine D, Rao PS, Valderrama E, Sturman JA. Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Am J Physiol* 1992;262:F117-F123.
7. Magil A. Inhibition of progression of chronic puromycin aminonucleoside nephrosis by probucol, an antioxidant. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2340-2347.
8. Túri S, Németh I, Torkos A, Sággy L, Varga I, Matkovics B, Nagy J. Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. *Free Rad Biol Med* 1997;22:161-168.
9. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997;29:465-477.
10. Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 1986;251:F765-F776.
11. Bannister JV, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987;22:111-180.
12. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982;107:397-418.
13. Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ. New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *J Clin Invest* 1987;79:1379-1387.
14. Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996;75:617-636.
15. Huberman A. Biología de los radicales de oxígeno, In: Bioquímica. Díaz ZJC, Hicks GJJ (eds). Interamericana-McGraw-Hill, México D.F., 1995.
16. Shah SV. The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu Rev Physiol* 1995;57:245-262.

17. Shah SV. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 1989;35:1093-1106.
18. Shah SV. Oxidant mechanisms in glomerulonephritis. *Sem Nephrol* 1991;11:320-326.
19. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erithrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.
20. Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:278-286.
21. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248:4793-4796.
22. Hsu JL, Visner GA, Burr IA, Nick HS. Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: Isolation, characterization and species comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:936-943.
23. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10405-10409.
24. Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T. The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single aminoacid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5219-5222.
25. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992;6:2675-2683.
26. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 1994;45:1-9.
27. Arthur JR, Beckett GJ. Newer aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium. *Proc Nutr Soc* 1994;53:615-624.
28. Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 1994;269:27066-27073.
29. Avissar NS, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubule are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994;266:C367-C365.
30. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem* 1991;109:918-923.
31. Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993;268:2571-2576.
32. Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckett R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced aminoacid sequence. *J Biol Chem* 1994;269:7342-7348.

33. Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem* 1995;270:26993-26999.
34. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. In: *Antioxidant Nutrients and Immune Functions*. Bendich A, Phillips M, Tengerdy RP (eds). Plenum Publishing Corporation, 1990.
35. Schuckelt R, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Roveri A, Reumkens J, Strabburger W, Ursini F, Wolf B, Flohé L. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a seleno-enzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Rad Res Comms* 1991;14:343-361.
36. Aebi HE. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 1982.
37. Price VE, Sterling WR, Tarantola VA, Hartley RW, Rechcigl M. The kinetics of catalase synthesis and destruction *in vivo*. *J Biol Chem* 1962;237:3468-3475.
38. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 1984;105:121-126.
39. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989;79:279-288.
40. Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:147-169.
41. Harris RC, Ismail N. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 1994;23:477-497.
42. Fiegelson EB, Drake JW, Recant L. Experimental aminonucleoside nephrosis in rats. *J Lab Clin Med* 1957;50:437-446.
43. Amato D, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Acosta J. Fisiopatología del síndrome nefrótico. In: *Tratado de Nefrología*. Martínez-Maldonado M, Rodicio JL, Herrera-Acosta J (eds). Ediciones Norma, Madrid, 1993.
44. Bernard DB. Extrarenal complications of the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1988;33:1184-1202.
45. Andreoli SP. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol* 1991;5:733-742.
46. Baliga R, Ueda N, Shah SV. Oxidant mechanisms in glomerular disease. *Curr Nephrol* 1997;20:135-151.
47. Ohtake T, Kimura M, Nishimura M, Hishida A. Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin-induced nephropathy. *J Lab Clin Med* 1997;129:81-88.
48. Kashem A, Endoh M, Yamauchi F, Yano N, Nomoto Y, Sakai H, Pronai L, Tanaka M, Nakazawa H. Superoxide dismutase activity in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1996;28:14-22.

49. Yoshioka T, Iwamoto N, Tsunoda Y, Higuchi C, Kawaguchi H, Ito K. Down-regulation of manganese-superoxide dismutase gene expression in idiopathic nephrotic syndrome. *J Pediatr* 1997;130:800-807.
50. Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Ibarra-Rubio ME, Chávez MT, Calleja C, Tapia E, Uribe MC, Romero L, Peña JC. Pathophysiology of experimental nephrotic syndrome induced by puromycin aminonucleoside in rats. I. The role of proteinuria, hypoproteinemia, and renin-angiotensin-aldosterone system on sodium retention. *Rev Invest Clin* 1990;42:29-38.
51. Frenk S, Antonowicz I, Craig JM, Metcoff J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside. Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955;89:424-427.
52. Hoyer JR, Mauer SM, Michael AF. Unilateral renal disease in the rat. I. Clinical, morphologic, and glomerular mesangial functional features of the experimental model produced by renal perfusion with aminonucleoside. *J Lab Clin Med* 1975;85:756-768.
53. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Podocyte architecture in puromycin aminonucleoside-treated rats administered tungsten or allopurinol. *Exp Nephrol* 1995;3:270-279.
54. Diamond JR, Karnovsky MJ. Exacerbation of chronic aminonucleoside nephrosis by dietary cholesterol supplementation. *Kidney Int* 1987;32:671-677.
55. Diamond JR. Hyperlipidemia of nephrosis: pathophysiologic role in progressive glomerular disease. *Am J Med* 1989;87:25N-26N.
56. Diamond JR. A putative role of hypercholesterolemia in progressive glomerular injury. *Annu Rev Med* 1992;43:83-92.
57. Zent R, Ailenberg M, Waddell TK, Downey GP, Silverman M. Puromycin aminonucleoside inhibits mesangial cell-induced contraction of collagen gels by stimulating production of reactive oxygen species. *Kidney Int* 1995;47:811-817.
58. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis: *in vitro* studies. *Kidney Int* 1994;45:1057-1069.
59. Gwinner W, Landmesser U, Brandes RP, Kubat B, Plasger J, Eberhard O, Koch KM, Olbricht CJ. Reactive oxygen species and antioxidant defense in puromycin aminonucleoside glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1722-1731.
60. Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int* 1991;40:291-301.
61. Pedraza-Chaverri J, Arévalo AE. Tissue lipoperoxidation and glutathione peroxidase activity in puromycin aminonucleoside injected rats. *Int J Biochem* 1994;26:1139-1145.
62. Shibouta Y, Terashita ZI, Imura Y, Shino A, Kawamura M, Ohtsuki K, Ohkawa S, Nishikawa K, Fujiwara Y. Involvement of thromboxane A₂, leukotrienes and free radicals in puromycin nephrosis in rats. *Kidney Int* 1991;39:920-929.
63. Pedraza-Chaverri J, Arévalo AE, Hernández-Pando R, Larriva-Sahd J. Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:683-691.

64. Lee HS, Jeong JY, Kim BC, Kim YS, Zhang YZ, Chung HK. Dietary antioxidant inhibits lipoprotein oxidation and renal injury in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1997;51:1151-1159.
65. Fawcett JP, Jiang R, Walker RJ. Time course of lipid peroxidation in puromycin aminonucleoside-induced nephropathy. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1994;86:227-234.
66. Trachtman H, Schwob N, Maesaka J, Valderrama E. Dietary vitamin E supplementation ameliorates renal injury in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1811-1819.
67. Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside-treated rats. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1974-1986.
68. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986;29:478-483.
69. Beaman M, Birtwistle R, Howie AJ, Michael J, Adu D. The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in glomerular injury induced by puromycin aminonucleoside in rats. *Clin Sci* 1987;73:329-332.
70. Thakur V, Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in puromycin aminonucleoside-induced proteinuria. *Kidney Int* 1988;34:494-499.
71. Fawcett JP, Schiller B, Jiang R, Moran J, Walker RJ. Supplementation with L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, a cysteine precursor, does not protect against lipid peroxidation in puromycin aminonucleoside-induced nephropathy. *Exp Nephrol* 1996;4:248-252.
72. Ghiggeri GM, Cercignani G, Ginevri F, Bertelli R, Zetta L, Greco F, Candiano G, Trivelli A, Gusmano R. Puromycin aminonucleoside metabolism by glomeruli and glomerular epithelial cells *in vitro*. *Kidney Int* 1991;40:35-42.
73. Nosaka K, Takahashi T, Nishi T, Imaki H, Suzuki T, Suzuki K, Kurokawa K, Endou H. An adenosine deaminase inhibitor prevents puromycin aminonucleoside nephrotoxicity. *Free Rad Biol Med* 1997;22:597-605.
74. Ginevri F, Gusmano R, Oleggini R. Renal purine efflux and xanthine oxidase activity during experimental nephrosis in rats: difference between puromycin aminonucleoside and adriamycin nephrosis. *Clin Sci* 1990;293:283-293.
75. Tada M, Kondo T, Ogawa Y, Sugiyama S, Ozawa T. The effect of Dilazep on puromycin-induced rat renal mitochondrial dysfunction. *Drug Res* 1987;37:509-512.
76. Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in passive Heymann nephritis in rats. *Am J Physiol* 1988;254:F337-F344.
77. Kashihara N, Watanabe Y, Makino H, Wallner EI, Kanwar YS. Selective decreased *de novo* synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6309-6313.

78. Raats CJJ, Bakker MAH, van den Born J, Berden JHM. Hydroxyl radicals depolymerize glomerular heparan sulfate *in vitro* and in experimental nephrotic syndrome. *J Biol Chem* 1997;272:26734-26741.
79. Halliwell B, Gutteridge JM. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human diseases. *Am J Med* 1991;91:14S-18S.
80. Hynder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1991;126:104-105.
81. Lang MG, Noll G, Lüscher TF. Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: modulation by endothelial factors. *Am J Physiol* 1995;269:H837-H844.
82. Beierwaltes WH, Sigmon DH, Carretero OA. Endothelium modulates renal blood flow but not autoregulation. *Am J Physiol* 1992;31:F943-F949.
83. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3375-3378.
84. McDonald LJ, Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;211:1-6.
85. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol* 1997;272:F561-F578.
86. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6770-6774.
87. Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:153-175.
88. Murad F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? *Recent Prog Horm Res* 1998;53:43-60.
89. Fleming I, Busse R. Endothelial nitric oxide formation. *Adv Pharmacol* 1994;26:188-197.
90. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolto SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
91. Melaragno MG, Fink GD. Role of ANG II in hypertension produced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in conscious rats. *Am J Physiol* 1996;271:H806-H811.
92. Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillan-Crow LA, Cornwell TL. cGMP signaling through cAMP-and- cGMP-dependentprotein kinases. *Adv Pharmacol* 1995;34:305-322.
93. Hirata H, Murad F. Interrelationships of cyclic GMP, inositol phosphates, and calcium. *Adv Pharmacol* 1994;26:195-216.
94. Hirata H, Kohse KP, Chang C, Ikebe T, Murad F. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989;265:1268-1273.

95. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983;52:352-357.
96. Block E, Cai XJ, Uden PC, Zhang X, Quimby BD, Sullivan JJ. *Allium* chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl Chem* 1996;68:937-944.
97. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 1985;252:114-119.
98. Augusti KT, Sheela CG. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* 1996;52:115-119.
99. Dausch JG, Nixon DW. Garlic: a review of its relationship to malignant disease. *Prev Med* 1990;19:346-361.
100. Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* 1996;154:55-63.
101. Bordia T, Mohammed N, Thomson M, Ali M. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;54:183-186.
102. Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD, Hughes BG. *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med* 1992;58:417-423.
103. Chang MLW, Johnson MA. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J Nutr* 1980;110:931-936.
104. Sodimu O, Joseph PK, Augusti KT. Certain biochemical effects of garlic oil on rats maintained on high fat-high cholesterol diet. *Experientia* 1984;40:78-80.
105. Sundaram SG, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1996;1315:15-20.
106. Sundaram SG, Milner JA. Diallyl disulfide suppresses the growth of human colon tumor cell xenografts in athymic nude mice. *J Nutr* 1996;126:1355-1361.
107. Brady JF, Wang MH, Hong JY, Xiao F, Li Y, Yoo JSH, Ning SM, Lee MJ, Fukuto JM, Gapac JM, Yang CS. Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991;108:342-354.
108. Brady JF, Ishizaki H, Fukuto JM, Lin MC, Fadel A, Gapac JM, Yang CS. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem Res Toxicol* 1991;4:642-647.
109. Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R. Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1993;119:143-150.
110. Suetsuna K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *J Nutr Biochem* 1998;9:415-419.
111. Das I, Khan NS, Sooranna SR. Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. *Biochem Soc Trans* 1995;23:136S-136S.

112. Das I, Khan NS, Sooranna SR. Potent activation of nitric oxide synthase by garlic: a basis for its therapeutic applications. *Curr Med Res Opin* 1995;13:257-263.
113. Das I, Hirani J, Sooranna S. Arginine is not responsible for the activation of nitric oxide synthase by garlic. *J Ethnopharmacol* 1996;53:5-9.
114. Horie T, Murayama T, Mishima T, Itoh F, Minamide Y, Fuwa T, Awazu S. Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med* 1989;55:506-508.
115. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 1994;60:417-420.
116. Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* 1995;148:183-189.
117. Török B, Belágyi J, Rietz B, Jacob R. Effectiveness of garlic on the radical activity in radical generating systems. *Arzneim -Forsch /Drug Res* 1994;44:608-610.
118. Lewin G, Popov I. Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 2nd communication: inhibition of the Cu²⁺-initiated oxidation of low density lipoproteins. *Drug Res* 1994;44:604-607.
119. Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 1996;10:340-341.
120. Sheen LY, Lii CK, Sheu SF, Meng RHC, Tsai SJ. Effect of active principle of garlic - diallyl sulfide - on cell viability, detoxification capability and the antioxidation system of primary rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 1997;34:971-978.
121. Wei Z, Lau BHS. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 1998;18:61-70.
122. Geng Z, Lau BHS. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 1997;11:54-56.
123. Numagami Y, Suto S, Ohnishi ST. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: A possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* 1996;29:135-143.
124. Singh SP, Abraham SK, Kesavan PC. In vivo radioprotection with garlic extract. *Mutation Res* 1995;345:147-153.
125. Pan J, Hong JY, Li D, Schuetz EG, Guzelian PS, Huang W, Yang CS. Regulation of cytochrome P450 2B1/2 genes by diallyl sulfone, disulfiram, and other organosulfur compounds in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1993;45:2323-2329.
126. Pan J, Hong JY, Ma BL, Ning SM, Paranawithana SR, Yang CS. Transcriptional activation of cytochrome P450 2B1/2 genes in rat liver by diallyl sulfide a compound derived from garlic. *Appl Biochem Biotec* 1993;302:337-342.
127. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
128. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.

129. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952-958.
130. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 1984;105:457-464.
131. Heim WG, Appleman D, Pyfrom HT. Effects of 3-amino-1,2,4-triazole (AT) on catalase and other compounds. *Am J Physiol* 1956;19-23.
132. Guidet BR, Shah SV. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* 1989;256:F158-F164.
133. Heim WG, Appleman D, Pyfrom HT. Production of catalase changes in animals with 3-amino-1,2,4-triazole. *Science* 1955;122:693-694.
134. Tephly TR, Mannering GJ, Parks RE. Studies on the mechanism of inhibition of liver and erythrocyte catalase activity by 3-amino-1,2,4-triazole (AT). *J Pharmacol Exp Med* 1961;134:77-82.
135. Nelson GH. Ethanol protection against the catalase-depressing effect of 3-amino-1,2,4-triazole. *Science* 1958;127:220-221.
136. Green FO, Feinstein RN. Quantitative estimation of 3-amino-1,2,4-triazole. *Anal Chem* 1957;29:1658-1660.
137. Margoliash E, Novogrodsky A, Schejter A. Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochem J* 1960;74:339-348.
138. Crane D, Holmes RS, Masters CJ. On the relative rates of synthesis and degradation of catalase in vertebrate tissues. *Int J Biochem* 1978;9:589-596.
139. Fang SC, George M, Yu TC. Metabolism of 3-amino-1,2,4-triazole-5-C¹⁴ by rats. *Agric Food Chem* 1964;12:219-223.
140. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 1998;30:225-243.
141. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 1990;15:129-135.
142. Halliwell B, Gutteridge JM. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Lett* 1981;128:347-352.
143. Morin B, Davies MJ, Dean RT. The protein oxidation product 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage. *Biochem J* 1998;330:1059-1067.
144. Paller MS, Patten M. Hydrogen peroxide and ischemic renal injury: effect of catalase inhibition. *Free Rad Biol Med* 1991;10:29-34.
145. Ueda N, Guidet B, Shah SV. Measurement of intracellular generation of hydrogen peroxide by rat glomeruli *in vitro*. *Kidney Int* 1994;45:788-793.
146. Guidet B, Shah SV. Enhanced in vivo H₂O₂ generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure. *Am J Physiol* 1989;257:F440-F445.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

147. Esterbauer H. Estimation of peroxidation damage. *Path Biol* 1996;44:25-28.
148. Bhuyan UN, Welbourn CRB, Evans DJ, Peters TJ. Biochemical studies of the isolated rat glomerulus and the effect of puromycin aminonucleoside administration. *Br J Exp Pathol* 1980;61:69-75.
149. Hattori T, Ito M, Suzuki Y. Studies on antinephritic effect of TJ-8014, *Syo-Saiko-To-Kyo-Shyokyo-Ka-Ouren-Bukuryou* (5): effects on puromycin aminonucleoside nephrosis and its mechanisms. *Japan J Pharmacol* 1991;56:465-473.
150. Wang JS, Yang AH, Chen SM, Young TK, Chiang H, Liu HC. Amelioration of antioxidant enzyme suppression and proteinuria in cyclosporin-treated puromycin nephrosis. *Nephron* 1993;65:418-425.
151. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982;257:5751-5754.
152. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* 1975;14:5299-5303.
153. Avissar N, Whitin JC, Allen PZ, Wagner DD, Liegey P, Cohen HJ. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. *J Biol Chem* 1989;264:15850-15855.
154. Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys* 1994;309:239-246.
155. Khanum F, Anilakumar KR, Sudarshanakrishna KR, Viswanathan KR. Effects of feeding fresh garlic oil on detoxifying enzymes and micronuclei formation in rats treated with azoxymethane. *Internat J Vit Nutr Res* 1998;68:208-213.
156. Dhahbi JM, Tillman JB, Cao S, Mote PL, Walford RL, Spindler SR. Caloric intake alters the efficiency of catalase mRNA translation in the liver of old female mice. *J Gerontol* 1998;53A:B180-B185.
157. Cvetkovic T, Vlahovic P, Pavlovic D, Kocic G, Jevtovic T, Djordjevic V. Low catalase activity in rats with ureteral ligation: Relation to lipid peroxidation. *Exp Nephrol* 1998;6:74-77.
158. Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME. Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-b1 and collagen gene expression. *Kidney Int* 1998;53:367-381.
159. van den Branden C, Verelst R, Vamecq J, Vanden Houte K, Verbeelen D. Effect of vitamin E on antioxidant enzymes, lipid peroxidation products and glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *Nephron* 1997;76:77-81.
160. Tacchini L, Pogliaghi G, Radice L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Post-transcriptional control of increased hepatic catalase gene expression in response to oxidative stress. *Redox Report* 1996;2:273-278.
161. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int* 1990;38:282-288.

162. Lai C-C, Peng M, Huang L, Huang W-H, Chiu TH. Chronic exposure of neonatal cardiac myocytes to hydrogen peroxide enhances the expression of catalase. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1157-1163.
163. Röhrdanz E, Kahl R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* 1998;24:27-38.
164. Clerch LB, Iqbal J, Massaro D. Perinatal rat lung catalase gene expression: influence of corticosteroid and hyperoxia. *Am J Physiol* 1991;260:L428-L433.
165. Clerch LB, Massaro D. Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA. *J Biol Chem* 1992;267:2853-2855.
166. Rechcigl MJr, Heston WE. Genetic regulation of enzyme activity in mammalian system by the alteration of the rates of enzyme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;27:119-124.
167. Furuta S, Hayashi H, Hijikata M, Miyazawa S, Osumi T. Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver catalase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:313-317.
168. Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1992;12:2525-2533.
169. Hass MA, Iqbal J, Clerch LB, Frank L, Massaro D. Rat lung Cu,Zn superoxide dismutase. Isolation and sequence of a full-length cDNA and studies of enzyme induction. *J Clin Invest* 1989;83:1241-1246.
170. Delabar JM, Nicole A, D'Auriol L, Jacob Y, Meunier-Rotival M, Galibert F, Sinet PM, Jérôme H. Cloning and sequencing of a rat CuZn superoxide dismutase cDNA. Correlation between CuZn superoxide dismutase mRNA level and enzyme activity in rat and mouse tissues. *Eur J Biochem* 1987;166:181-187.
171. Dougall WC, Nick HS. Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 1991;129:2376-2384.
172. Gwinner W, Tisher CC, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase in glomerular epithelial cells: Mechanisms for interleukin 1 induction. *Kidney Int* 1995;48:354-362.
173. Hass MA, Massaro D. Regulation of the synthesis of superoxide dismutases in rat lungs during oxidant and hyperthermic stresses. *J Biol Chem* 1988;263:776-781.
174. Yoshioka T, Homma T, Meyrick B, Takeda M, Moore-Jarrett T, Kon V, Ichikawa I. Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney Int* 1994;46:405-413.
175. Chang M, Reddy CC. Active transcription of the selenium-dependent glutathione peroxidase gene in selenium-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:1431-1436.