

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

"NEFROTOXICIDAD POR GENTAMICINA. EFECTO
PROTECTOR DEL AJO Y SU RELACION CON
SUPEROXIDO DISMUTASA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A
PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ





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.

Este trabajo 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 DGAPA (IN203797)

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá por haberme apoyado todo este tiempo.

A mis hermanos Salatiel y Luis.

A todos mis compañeros del laboratorio Angeles, Ivonne, Lupita, Omar, Pablo, Tino, Dra. Ibarra, Dra. Menjivar, Dr Pedraza por hacer grato mi trabajo en el laboratorio.

ABREVIATURAS

Ajo	Dieta de polvo de ajo al 2%
BUN	Nitrógeno de la urea en el plasma sanguíneo
CAT	Catalasa
Cu,Zn-SOD	Superóxido dismutasa de cobre y zinc
DDC	Dietilditiocarbamato
DFO	Deferoxamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTU	Dimetiltiourea
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EROs	Especies reactivas del oxígeno
GFR	Velocidad de filtración glomerular
GM	Gentamicina
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H&E	Hematoxilina y eosina
4-HNE	4-hidroxinonenal
LPx	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdehído
Mn-SOD	Superóxido dismutasa de manganeso
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidasa
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NO	Oxido nítrico
SOD-EC	Superóxido dismutasa extracelular
SON	Sintasa de óxido nítrico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
1. Especies reactivas de oxígeno (EROs)	3
1.1 Anión superóxido	3
1.2 Peróxido de hidrógeno	3
1.3 Radical hidroxilo	4
1.4 Singulete de oxígeno	4
2. Mecanismos de defensa antioxidante	6
2.1 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos	6
2.2 Mecanismos antioxidantes enzimáticos	7
2.2.A Superóxido dismutasa (SOD)	7
a) SOD de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD)	8
b) SOD de manganeso (Mn-SOD)	8
c) SOD extracelular	8
2.2.B Catalasa (CAT)	9
2.2.C Glutatión peroxidasa (GPx)	9
3. Gentamicina	9
3.1 Estructura química	9
3.2 Farmacocinética	10
3.3 Mecanismo de entrada a las células tubulares	11
3.4 Patología	11
3.5 Toxicidad	13
3.6 Mecanismo de inducción de la nefrotoxicidad	14
4. El ajo	15
4.1 Componentes	15
4.2 Propiedades antihipertensivas	17
4.3 Propiedades antioxidantes	17
III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	22
1. Reactivos	22
2. Dieta	22
3. Animales	23
4. Diseño Experimental	23
4.1 Determinaciones	23
5. Métodos empleados	24
5.1 Proteína total en la orina	24
5.2 Actividad de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en orina	24
5.3 Histología	25
5.4 Creatinina en el plasma y en la orina	25
5.5 Nitrógeno de la urea en el plasma sanguíneo (BUN)	26

5.6 Lipoperoxidación en la corteza renal	26
5.7 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	27
a) SOD total	27
b) SOD de manganeso (Mn-SOD)	28
c) SOD de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD)	28
5.8 Inmunoensayo "Western"	28
5.9 Contenido de gentamicina en la corteza renal	29
6. Análisis estadístico	30
VII. RESULTADOS	31
1. Peso corporal y volumen urinario	31
2. Alteraciones tubulares	31
2.1 Excreción de la NAG y de la proteína en orina	31
2.2 Análisis histológico	32
3. Alteraciones glomerulares	34
3.1 Creatinina sérica y depuración de la creatinina	34
3.2 Nitrógeno de urea (BUN)	34
4. Lipoperoxidación	35
5. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	36
5.1 En corteza	36
5.2 En médula	37
6. Inmunoensayo "Western" de la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD	38
6.1 En corteza	38
6.2 En médula	38
7. Contenido de gentamicina en la corteza renal	39
VIII. DISCUSIÓN	40
IX. CONCLUSIONES	45
X. BIBLIOGRAFÍA	46

I. RESUMEN

1. Antecedentes

Uno de los principales aminoglicósidos que se administra en la práctica médica es la gentamicina (GM), ya que exhibe un amplio espectro bactericida especialmente contra bacterias gramnegativas y es efectivo contra organismos resistentes a β -lactámicos. Sus indicaciones médicas cubren una gran variedad de enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Hoy en día, los aminoglicósidos representan aproximadamente el 20% de las drogas antimicrobianas usadas en pacientes hospitalizados. Sin embargo, se ha estimado que un 30% de los pacientes tratados con GM por más de 7 días muestran signos de nefrotoxicidad. A pesar de que la nefrotoxicidad es reversible en casi todos los casos y que rara vez conduce a un desenlace fatal *per se*, la disfunción renal secundaria a la terapia con aminoglicósidos encarece y complica el manejo de los pacientes hospitalizados.

2. Justificación

Aunque existen agentes más nuevos como las cefalosporinas de tercera generación, los cuales son menos tóxicos que los aminoglicósidos, estos siguen siendo los agentes antibacterianos de elección. Por lo tanto, el valor en el uso médico de la GM aumentaría si se encontrara la manera de proteger al riñón de este efecto colateral indeseable. El mecanismo por el cual la GM induce nefrotoxicidad no está claro; sin embargo, existen evidencias que apoyan la participación de las especies reactivas de oxígeno (EROs).

3. Obejtivos

Dada la importancia de la GM y dado que existen evidencias que apoyan la participación de las EROs en la nefrotoxicidad inducida por este antibiótico, en este trabajo exploramos el posible efecto protector de una dieta de polvo de ajo al 2% (ajo) sobre la nefrotoxicidad inducida por GM y sobre las defensas antioxidantes de la rata, ya que se sabe que el polvo de ajo posee propiedades antioxidantes y puede modular la expresión de algunas enzimas antioxidantes.

4. Métodos

El trabajo se realizó en ratas macho de la cepa Wistar de 150 a 200 g de peso. Dos semanas antes del tratamiento con GM, las ratas se alimentaron con una dieta control y una con 2% de polvo de ajo. Las ratas se dividieron en 4 grupos: 1) CONTROLES (CT); 2) GENTAMICINA (GM); 3) AJO (A) y 4) GENTAMICINA + AJO (GM+A). La GM se administró subcutáneamente cada 12 h por 6 días en una dosis de 75 mg/Kg de peso. Los días 0, 3, 5

y 7 se recolectó la orina de 24 h. Doce horas después de la última inyección con GM, los animales se sacrificaron por decapitación para obtener la sangre y los riñones. La función tubular se evaluó midiendo la excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y de proteínas totales y el daño tubular se evaluó por microscopía de luz. La función glomerular se evaluó midiendo el nivel de creatinina y del nitrógeno de urea en el plasma, así como por la depuración de la creatinina. La función oxidativa se evaluó midiendo el contenido de malondialdehído y 4-hidroxinonenal en la corteza renal. La actividad y la cantidad de Mn-SOD y de Cu,Zn-SOD se midió en la corteza y la médula renal. El contenido de GM se midió en la corteza renal.

5. Resultados

El daño tubular en las ratas tratadas con GM se hizo evidente por el incremento en la excreción urinaria de NAG, de proteínas totales y por el marcado daño histológico en esta sección de la nefrona. El polvo de ajo evitó parcialmente el incremento en la excreción urinaria de NAG y de proteínas totales y disminuyó significativamente el daño histológico inducido por GM. La alteración de la función glomerular se hizo evidente por el aumento en los niveles de la creatinina y del nitrógeno de urea en el plasma, así como por la disminución en la depuración de la creatinina en las ratas tratadas con GM. El polvo de ajo previno parcialmente el incremento en los niveles de creatinina y de nitrógeno de urea en plasma y evitó la disminución en la depuración de creatinina. El polvo de ajo evitó el incremento de la lipoperoxidación en las ratas tratadas con GM. La GM disminuyó la actividad pero no la cantidad de Mn-SOD en la corteza renal y no tuvo efecto sobre la actividad y la cantidad de Cu,Zn-SOD en la corteza y en la médula renal. El polvo de ajo evitó la disminución en la actividad de la Mn-SOD y no modificó el contenido de GM en la corteza renal de las ratas tratadas con GM.

6. Conclusiones

Estos resultados sugieren que el polvo de ajo disminuye la nefrotoxicidad inducida por la GM previniendo el incremento en la lipoperoxidación y evitando la inactivación de la Mn-SOD, la cual puede ser secundaria a una producción excesiva de EROs. El efecto del polvo de ajo se puede deber a sus propiedades antioxidantes intrínsecas.

II. INTRODUCCIÓN

1. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

En los organismos aeróbicos el oxígeno (O_2) es esencial en el mantenimiento de la vida ya que su ausencia conduce rápidamente a la muerte. Sin embargo, altas concentraciones de O_2 son tóxicas debido a la producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs). Algunas de ellas se forman por la reducción incompleta del oxígeno (O_2), a través de la vía univalente. (Cuadro 1) (Bast *et al.*, 1991).

Cuadro 1. Vía univalente para la reducción del oxígeno.

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$	Anión superóxido (radical libre)
$O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + \cdot OH$	Radical hidroxilo (radical libre)
$\cdot OH + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$	Agua

A continuación se mencionan algunas características de las EROs:

1.1 Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Es el producto de la incorporación de un electrón a una molécula de oxígeno. Tiene una reactividad limitada en medio acuoso. Sin embargo, es un agente tóxico, porque puede difundir y encontrar las condiciones en las que da lugar a la aparición de agentes más reactivos como el radical hidroxilo (Weiss, 1986). Las principales fuentes de $O_2^{\cdot-}$ son las reacciones de: a) la xantina oxidasa durante el catabolismo de las bases púricas, b) la NADPH oxidasa en muchas células como las endoteliales, las de macrófagos, las de neutrófilos, etc. (Weiss, 1986; Cohen *et al.*, 1988) y c) la autooxidación de la coenzima Q semireducida (ubisemiquinona) en la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias (Sohal *et al.*, 1989).

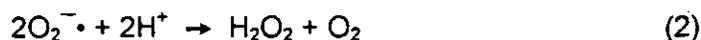
1.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La vida media del H_2O_2 depende de la presencia o ausencia de las enzimas encargadas de removerlo del medio como la catalasa o la glutatión peroxidasa. No es un radical libre debido a que no posee electrones desapareados. Sin embargo, es un agente que puede difundir a

través de las membranas celulares al espacio extracelular, donde existen pocos mecanismos de defensa antioxidante y donde puede participar en la formación del radical hidroxilo vía la reacción de Haber-Weiss, la cual ocurre en presencia de un metal de transición que puede ser Fe^{3+} o Cu^{2+} . (reacciones 1 y 2) (Johnson *et al.*, 1987).



La principal fuente de producción de H_2O_2 es la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$, reacción intracelular catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). Además, en medio acuoso el $\text{O}_2^{\cdot-}$ dismuta de manera espontánea generando H_2O_2 y oxígeno singulete (Bannister & Rotilio, 1987).



1.3 Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

Tiene una vida media de 10^{-9} s, puede generarse por la ruptura homolítica del oxígeno del H_2O_2 , generando un radical hidroxilo y un ion hidroxilo que se protona para formar agua vía la reacción de Fenton (reacción 3).



El radical hidroxilo reacciona a una velocidad muy alta con casi todas las moléculas biológicas: carbohidratos, aminoácidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos, formando entre otros productos, radicales libres de aquellas moléculas con las que reaccionó (Janssen *et al.*, 1993). Las células no cuentan con sistemas enzimáticos que puedan usar al radical hidroxilo como sustrato; más bien tienen mecanismos enzimáticos para prevenir su formación.

1.4 Singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

Esta especie química no posee electrones desapareados por lo que no es un radical libre; sin embargo, es muy reactivo. Se forma cuando algunos pigmentos son iluminados en presencia del oxígeno. Posee una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo los lípidos de las membranas (Huberman, 1985).

En el cuadro 2 se resumen las características de las especies reactivas del oxígeno.

Cuadro 2. Especies reactivas del oxígeno.

Especie	Símbolo	Vida media	Propiedades
Anión superóxido	$O_2^{\cdot -}$	10^{-6} s (enzimas)	oxidante débil, lenta capacidad para difundir
Radical hidroxilo	OH^{\cdot}	10^{-9} s	extremadamente reactivo, nula capacidad para difundir
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	depende de enzimas	oxidante o reductor, alta capacidad para difundir
Singulete de oxígeno	1O_2		alta capacidad oxidante, lenta capacidad para difundir

Por su reactividad, las EROs existen en concentraciones muy bajas (10^{-4} a 10^{-9} M) y no viajan muy lejos del sitio donde se formaron (excepto el H_2O_2). El radio promedio de acción del radical hidroxilo (el más reactivo) es de 30 Å y su vida media es de unos microsegundos, de manera que un radical hidroxilo formado en la mitocondria es poco probable que tenga efecto directo en otras partes de la célula. Cuando un radical libre reacciona con otras moléculas puede formar otros radicales, induciendo una reacción en cadena, en donde el radical inicial sólo produce efectos locales y el radical secundario y los productos de la degradación oxidativa de estos producen radicales libres que pueden tener efectos a distancia del sitio donde se formó el primer radical libre (Zentella *et al.*, 1994).

Las EROs pueden alterar moléculas biológicas como:

☆ Proteínas. Modificando aminoácidos susceptibles como: cisteína, histidina, metionina, triptófano y tirosina, lo que puede conducir a: 1) alteración directa de la estructura y función de la proteína y 2) aceleración de la proteólisis endógena selectiva (Stadtman *et al.*, 1990).

☆ Carbohidratos. Provocando la ruptura de los polisacáidos (Thornalley *et al.*, 1984).

☆ Ácidos nucleicos. Provocando hidroxilación de las bases, entrecruzamientos y la escisión de las cadenas del DNA lo que causa mutaciones e inhibición de la síntesis de proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos (Fraga *et al.*, 1990).

☆ Lípidos. Causando la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana celular u orgánitos subcelulares (lipoperoxidación).

La lipoperoxidación, se define como el conjunto de reacciones de oxidación que son el resultado de la interacción de las EROs con los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el ácido araquidónico (Gutteridge & Halliwell, 1990).

2. Mecanismos de defensa antioxidante

Las células toleran la producción de EROs sólo si su concentración se mantiene en valores bajos. Por su potencial efecto destructivo, las EROs generadas en condiciones fisiológicas en muchas partes de la célula, son controladas por agentes detoxificantes intracelulares, enzimas y/o atrapadores presentes en las células.

2.1 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos

Un gran número de compuestos poseen propiedades antioxidantes, determinado por su capacidad para prevenir la lipoperoxidación o las reacciones catalizadas por metales. Una forma de caracterizar a estos compuestos es en base a su solubilidad en solventes polares o apolares (Krinsky, 1988).

El cuadro 3 resume las características de los principales antioxidantes no enzimáticos liposolubles.

Cuadro 3. Sistemas antioxidantes no enzimáticos liposolubles

<i>Antioxidante</i>	<i>Localización</i>	<i>Función</i>
Vitamina E	membranas, fluidos extracelulares	Interrumpe la LPx en la fase de propagación
Carotenos	membranas	atrapa 1O_2 , reacciona con radicales peroxilo (ROO•)
Bilirrubina	tejidos y sangre	Reacciona con ROO• y 1O_2

Krinsky, 1992

El cuadro 4 resume las características de los principales antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles.

Cuadro 4. Sistemas antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles

Antioxidante	Localización	Función
Vitamina C (ascorbato)	intracelular y extracelular	atrapa OH• y reacciona lentamente con el O ₂ ^{-•} (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)
Glutación	intracelular	es sustrato de la GPx en el ciclo redox, reacciona con OH• y O ₂ ^{-•} , así como con radicales libres orgánicos.
Acido úrico	extracelular	atrapa OH•, ¹ O ₂ y ROO•, se une a metales de transición.

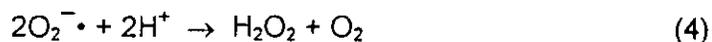
Krinsky, 1992

2.2 Mecanismos antioxidantes enzimáticos

Estos mecanismos incluyen las siguientes enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutación peroxidasa (GPx), glutación reductasa, peroxidasa dependiente de tioredoxina y sistemas regeneradores de NADPH, que previenen la formación de nuevos radicales libres. Dichas enzimas convierten a las EROs en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar.

2.2.A Superóxido dismutasa (SOD) (Óxido reductasa EC 1.15.1.1)

Esta enzima esta presente en los organismos aerobios y cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno (reacción 4).



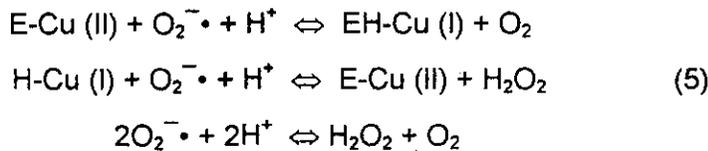
En la rata la actividad de SOD esta presente en todos los tejidos, encontrándose los mayores niveles en el hígado y el riñón (Frederiks & Bosch, 1997).

En mamíferos la SOD posee tres isomorfias: Mn-SOD, Cu,Zn-SOD y SOD-EC. Las tres isomorfias se sintetizan en los ribosomas citoplásmicos, todas producto de genes nucleares diferentes (Ho *et al.*, 1991).

La SOD no es realmente una enzima detoxificante ya que el producto de su actividad el H₂O₂, es un agente tóxico. Sin embargo, la dismutación del anión superóxido es el primer paso de una cascada enzimática que conduce a su inactivación completa.

a) SOD de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD)

Esta enzima se localiza principalmente en el citoplasma de eucariotes aunque también se ha encontrado en lisosomas, el núcleo y en menor cantidad en los peroxisomas y el espacio intermembranoso mitocondrial. También se localiza en el cloroplasto y en algunas bacterias (Weisiger & Fridovich, 1973; Hsu *et al.*, 1992). Es una proteína homodimérica de 34 kDa y 4 subunidades (Hsu *et al.*, 1992; Crapo *et al.*, 1992). Cada subunidad contiene 151 aminoácidos junto con un átomo de cobre (Cu^{2+}) y otro de zinc (Zn^{2+}) en su sitio activo unidos por el imidazolato de una histidina (Tainer *et al.*, 1983). Esta isomorfa cataliza la dismutación del anión superóxido a través de la reducción-oxidación alternativa del cobre (reacción 5).



b) SOD de manganeso (Mn-SOD)

Aunque la Mn-SOD del humano y de la rata son similares en el contenido de aminoácidos y de manganeso, el tamaño y la estructura por subunidad; la distribución subcelular así como la actividad presente en un homogeneizado es diferente. Por ejemplo, en el hígado humano está presente en el citoplasma y en la mitocondria y representa más del 50% de la actividad de la SOD total (Salin *et al.*, 1978), mientras que en el hígado de las ratas se localiza estrictamente en la matriz mitocondrial y representa sólo el 10% o menos de la actividad de la SOD total (Tyler, 1975). Es un homotetrámero con peso molecular de 90 kDa. El análisis por absorción atómica de una subunidad de esta isomorfa sugiere que ésta contiene 223 aminoácidos, un átomo de manganeso y un peso de 22.5 kDa (Salin *et al.*, 1978). La dismutación del anión superóxido ocurre porque el átomo de manganeso cambia su estado de oxidación al interaccionar con el.

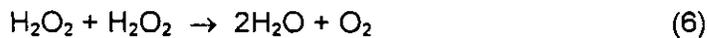
c) SOD extracelular (SOD-EC)

Es una glicoproteína tetramérica que pesa 120 kDa y que contiene cobre y zinc en su sitio activo (Marklund, 1982a). Esta isomorfa casi no se encuentra en tejidos ya que del 90-99% de la SOD-EC se localiza en los fluidos extracelulares (Marklund, 1982b). Una característica de esta isomorfa es que puede ser clasificada en tres fracciones de acuerdo a su afinidad a la heparina: fracción A, sin afinidad a la heparina; fracción B, con poca afinidad a la heparina y

fracción C, con alta afinidad a la heparina. La unión de la SOD-EC a la heparina es de naturaleza electrostática ya que posee un dominio de aminoácidos básicos cerca de su carboxilo terminal, conocido como dominio de unión a la heparina. En la rata sólo están presentes las fracciones A y B mientras que en el humano y otros mamíferos como el conejo, el cobayo, el cerdo, etc., están presentes las tres fracciones, predominando la fracción C (Marklund & Karlsson, 1990).

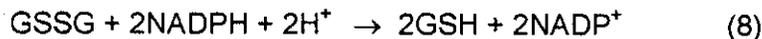
2.2.B Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

Es una hemoproteína tetramérica de 240 kDa. Se localiza principalmente en peroxisomas. Cataliza la transformación del H_2O_2 en H_2O y O_2 (reacción 6).



2.2.C Glutación peroxidasa (GPx)

Esta enzima también confiere protección a la célula ante un exceso de H_2O_2 . Cataliza la oxidación del glutatión (GSH) a disulfuro glutatión (GSSG) (reacción 7), el cual es reducido por la enzima glutatión reductasa en presencia del NADPH (reacción 8). La forma activa de GPx contiene selenio.



Si se altera el balance entre la formación de EROs y los mecanismos antioxidantes por incremento de los primeros o debilitamiento de los segundos, las EROs inducen reacciones en cadena, que pueden dañar a las moléculas biológicas.

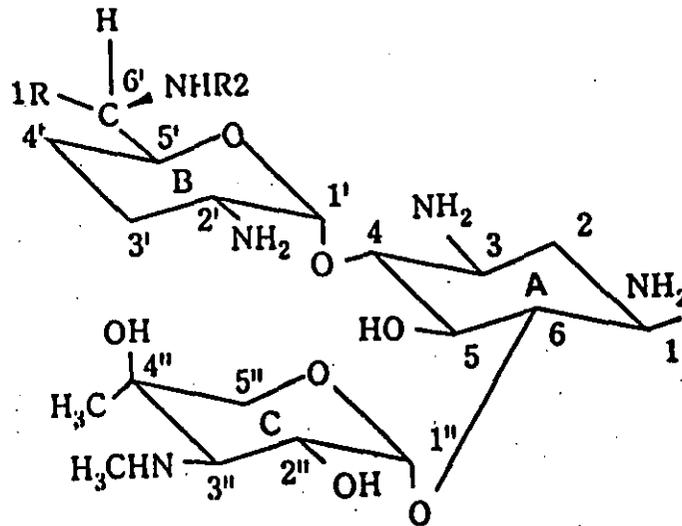
3. Gentamicina

3.1 Estructura química

Estructuralmente los aminoglicósidos se pueden considerar como oligosacáridos, aunque el componente característico de su molécula es el aminociclitol (anillo A) y no un azúcar. El

aminociclitol esta unido a través de dos enlaces glicosídicos a dos aminoazúcares (anillos B y C). Esquema 1, (Laurent & Tulkens, 1987).

La GM es un complejo de por lo menos tres antibióticos relacionados estructuralmente, denominados: Gentamicina C1 (40%), C1a (20%) y C2 (40%); productos de la fermentación de *Micromonospora purpurea*. La diferencia entre estos tres componentes reside en la presencia y en el número de grupos metilo, ligados al carbono 6' (Calderon, 1996). En C1, tanto R1 como R2 son CH₃; en C1a, tanto R1 como R2 son H y en C2, R1 es CH₃ y R2 es H (Esquema 1).



Esquema 1. Fórmula estructural de la gentamicina (GM).

La acción bactericida de la GM involucra su unión a la subunidad 30S (interactuando en una zona que contiene las proteínas S3, S4, S5 y S12), aunque también puede unirse a la subunidad 50S (con la proteína L6) del ribosoma, causando cambios en la forma de este e interrumpiendo los pasos iniciales de la síntesis de proteínas (Kacew & Bergeron, 1990).

3.2 Farmacocinética

La GM es una molécula policationica a pH fisiológico, altamente polar, que no se absorbe en el tracto gastrointestinal, pero que se absorbe rápidamente después de una inyección subcutánea o intramuscular. Su vida media en el plasma sanguíneo es de 2-3 h en el humano y de 30 min en los animales pequeños de laboratorio (Laurent & Tulkens, 1987). La unión de la GM a las proteínas plasmáticas es mínima. No se conocen metabolitos de la GM y se excreta

por filtración glomerular, eliminándose en la orina; sin embargo, una pequeña parte (3-5%) se reabsorbe y se transporta al interior de las células del túbulo proximal (Bennett, 1989; Laurent & Tulkens, 1987). Consecuentemente los niveles de la GM en tejidos son bajos, excepto en la corteza renal donde su vida media es 200 veces superior a la vida media en el suero sanguíneo (Laurent & Tulkens, 1987).

3.3 Mecanismo de entrada a las células tubulares

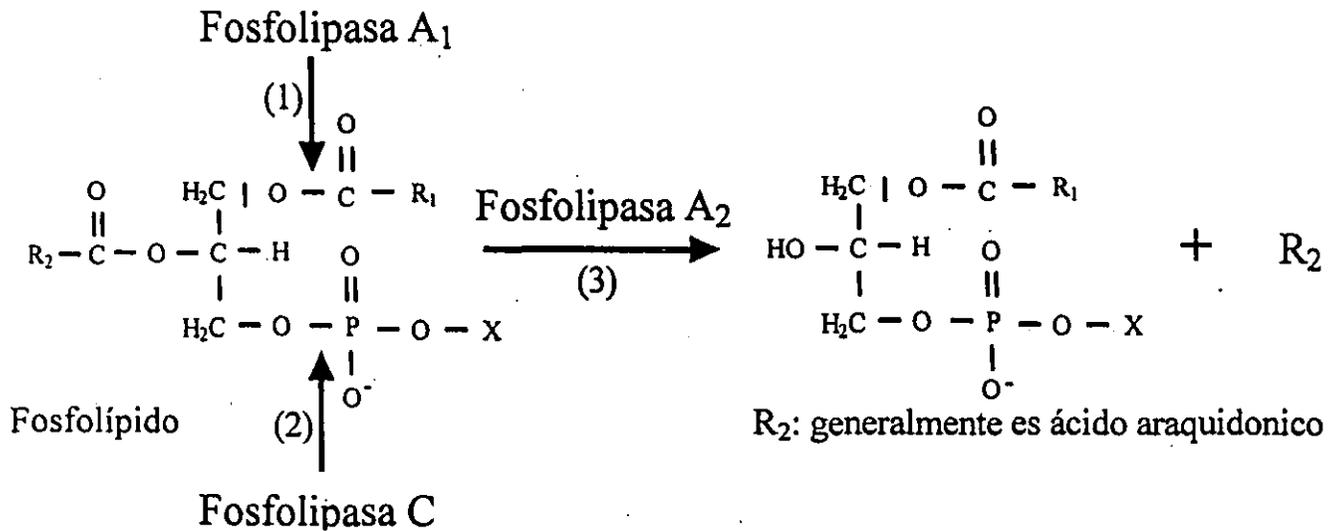
Se ha propuesto que la GM es transportada al interior de las células tubulares por pinocitosis, a través de un mecanismo análogo a la reabsorción de las proteínas en este segmento de la nefrona (Silverblatt & Kuehn, 1979). Aunque las macromoléculas son transportadas usualmente por pinocitosis, las moléculas de bajo peso molecular como la GM también pueden ser transportadas por un mecanismo similar. La GM puede unirse por atracciones electrostáticas con los fosfolípidos de la membrana de las células tubulares, debido a que es una molécula policatiónica a pH fisiológico (Esquema 1) (Sastrasinh *et al.*, 1982). La entrada de la GM se inicia cuando ésta se une a las invaginaciones de la superficie membranal de las células en borde de cepillo. Esta invaginación forma vesículas pinocíticas apicales que posteriormente crecen para formar vacuolas mayores que son transportadas a la parte media y basal de la célula donde se fusionan con los lisosomas primarios. La GM se acumula en los lisosomas secundarios (Silverblatt & Kuehn, 1979).

3.4 Patología

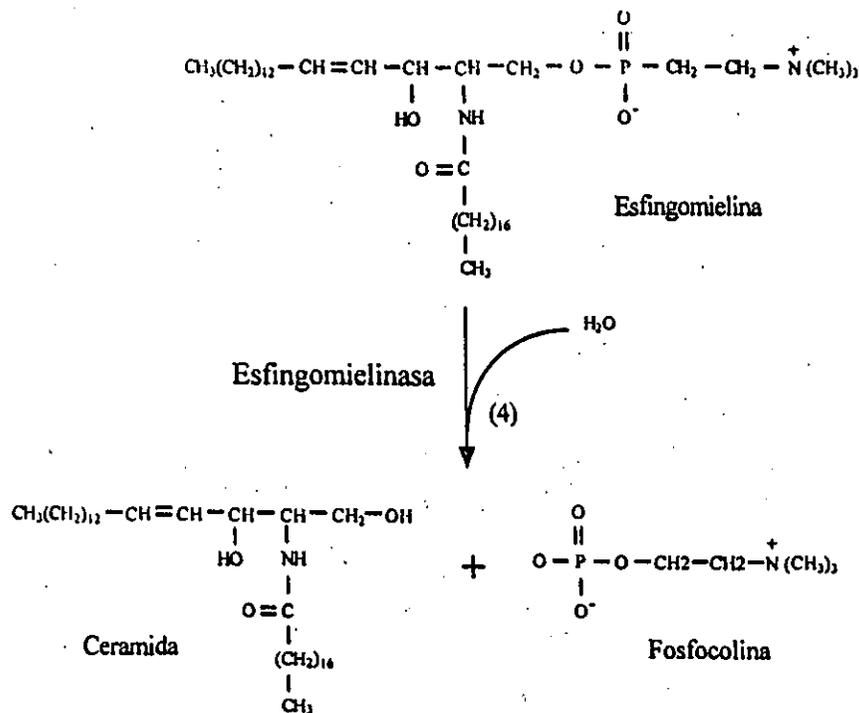
Una vez que la GM entra en las células del túbulo proximal, se acumula en los lisosomas secundarios donde inactiva las enzimas como la fosfolipasa A₁, la fosfolipasa C y la esfingomielinasa (Laurent, 1990) mismas que catalizan las reacciones 1, 2 y 4 respectivamente en el esquema 2 y 3, causando aumento en los fosfolípidos e interfiriendo con la función normal de los lisosomas; sin embargo, el mecanismo por el cual lo hace aún se desconoce. Esta alteración podría ser el primer paso de una serie de eventos que llevan a la necrosis tubular (Silverblatt & Kuehn, 1979).

Algunos autores creen que la acumulación de la GM en los lisosomas del túbulo proximal puede explicar la nefrotoxicidad inducida por este antibiótico. Sin embargo, la concentración de GM en los túbulos no necesariamente correlaciona con la nefrotoxicidad, ya que se ha informado que la SOD y la dimetiltiourea (DMTU) protegen contra la nefrotoxicidad por GM sin

afectar el contenido de este antibiótico en la corteza renal (Nakajima *et al.*, 1994). Así mismo, el tratamiento con ácido poliaspártico protege contra la nefrotoxicidad sin modificar el contenido renal de la GM (Ramsammy *et al.*, 1989). Por otro lado, se ha encontrado que la administración de piridoxal-5-fosfato reduce en un 40% los niveles de GM renal, pero no reduce la nefrotoxicidad (Kacew, 1989).



Esquema 2. Reacciones catalizadas por la fosfolipasa A₁(1), C (2) y A₂ (3).



Esquema 3. Reacción catalizada por la esfingomielinasa en los lisosomas.

3.5 Toxicidad

La administración de la GM puede llevar a la manifestación de algunos efectos colaterales como neurotoxicidad, ototoxicidad y nefrotoxicidad. Actualmente la neurotoxicidad ocurre muy poco debido al ajuste en la dosis del antibiótico y a la duración del tratamiento. La ototoxicidad ocurre como resultado del daño al oído interno y aún se encuentra en un 3-5% de los pacientes tratados con GM. La nefrotoxicidad es el efecto colateral más frecuentemente asociado a la administración de GM, ya que se ha estimado que el 30% de los pacientes tratados con este antibiótico por más de 7 días muestran signos de nefrotoxicidad (Mathew, 1992). La GM ejerce diferentes efectos en múltiples sitios de la nefrona (Weinberg *et al.*, 1985). Las principales alteraciones bioquímicas y funcionales inducidas por la GM se mencionan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Alteraciones bioquímicas y funcionales asociadas con el uso de GM

1. Disminución de la velocidad de la filtración glomerular.
2. Alteración de la capacidad para concentrar la orina.
3. Deterioro en el manejo de los electrolitos.
4. Disminución de la reabsorción en el túbulo proximal.
5. Incremento en la excreción urinaria de la proteína y de algunas enzimas como la N-acetil-β-D-glucosaminidasa.
6. Fosfolipidosis renal y un aumento en la excreción urinaria de los fosfolípidos.
7. Alteraciones mitocondriales. Disminución en la cadena respiratoria y síntesis de ATP.
8. Inhibición de la ATPasa de Na⁺/K⁺

(Tulkens, 1989; Bennett, 1983; Kaloyanides, 1984)

Histológicamente, el túbulo proximal es el sitio primario de daño por GM (Nakajima *et al.*, 1994). Los signos clínicos característicos de la nefrotoxicidad inducida por la GM son: aumento de la urea en el plasma sanguíneo y la creatinina sérica como resultado de la disminución en la velocidad de filtración glomerular (GFR). En las ratas se pueden reproducir alteraciones funcionales similares a las encontradas en humanos, cuando las ratas se tratan con dosis altas de GM (Schor *et al.*, 1981); sin embargo, el deterioro de la función renal es reversible cuando se suspende la administración del antibiótico (Laurent & Tulkens, 1987).

3.6 Mecanismo de inducción de la nefrotoxicidad

En algunos modelos experimentales, se ha demostrado que las EROs juegan un papel esencial en el mecanismo de generación de varias enfermedades renales como: insuficiencia renal aguda (Walker & Shah, 1988; Shah & Walker, 1992; Walker *et al.*, 1999), isquemia-reperusión (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1992), rechazo al trasplante renal (MacMillan-Crow *et al.*, 1996), síndrome nefrótico (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1999; Pedraza-Chaverri *et al.*, 1995b), etc. Las EROs son producidas por las células renales y por las células inflamatorias que invaden al riñón. Independientemente de su origen, las EROs pueden dañar la membrana basal glomerular y alterar las funciones tubulares y glomerulares (Baud & Raymond, 1986).

En el modelo de insuficiencia renal inducida por la GM, no hay un acuerdo en la literatura con relación al mecanismo de acción de la GM o con relación a los factores que modulan la nefrotoxicidad por este antibiótico (Kacew & Bergeron, 1990; Appel, 1990).

Al igual que en los modelos mencionados anteriormente, existe evidencia que sugiere la participación de las EROs en la nefrotoxicidad inducida por la GM (Cuadro 6). Sin embargo, no se conoce el mecanismo por medio del cual la GM aumenta la producción de las EROs, así como tampoco se ha establecido una asociación temporal entre las alteraciones bioquímicas producidas por la GM como la fosfolipidosis y la producción de las EROs.

Cuadro 6. Evidencias que sugieren un papel de las EROs en la nefrotoxicidad inducida por la GM

⌘ Evidencias *in vitro*

- La GM aumenta la generación del anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo en la mitocondria renal (Walker & Shah, 1987; Yang *et al.*, 1995).
- La GM *in vitro* aumenta la liberación del hierro de la mitocondria renal cortical (Ueda *et al.*, 1993).
- La formación de complejos hierro-gentamicina causa lipoperoxidación y es un potente catalizador para la formación de los radicales libres (Priuska & Schacht, 1995).

⌘ Evidencias *in vivo*

- Hay aumento en la generación del peróxido de hidrógeno en la corteza renal de las ratas tratadas con GM (Guidet & Shah, 1989).
- Uno de los eventos que acompaña el desarrollo de la nefrotoxicidad inducida por la GM en la corteza renal es un aumento de la lipoperoxidación (Nakajima *et al.*, 1994; Ramsammy *et al.*, 1985).

-continuación-

➤ Los atrapadores de radicales hidroxilo como dimetiltiourea (DMTU), dimetilsulfóxido (DMSO) o benzoato de sodio protegen contra el daño renal agudo inducido por GM (Walker & Shah, 1988; Nakajima *et al.*, 1994).

➤ Los quelantes de hierro como la deferoxamina (DFO) protegen de la formación de radicales hidroxilo inducida por la GM en las mitocondrias renales (Yang *et al.*, 1995) y en ratas inyectadas con GM (Walker & Shah, 1988).

➤ La administración de superóxido dismutasa disminuye marcadamente la nefrotoxicidad inducida por la GM, lo que sugiere una participación del anión superóxido (Nakajima *et al.*, 1994; Ali & Bashir, 1996).

➤ La administración de hierro en la dieta o por vía intramuscular aumenta la nefrotoxicidad inducida por GM (Kays *et al.*, 1992; Ben-Ismael *et al.*, 1994).

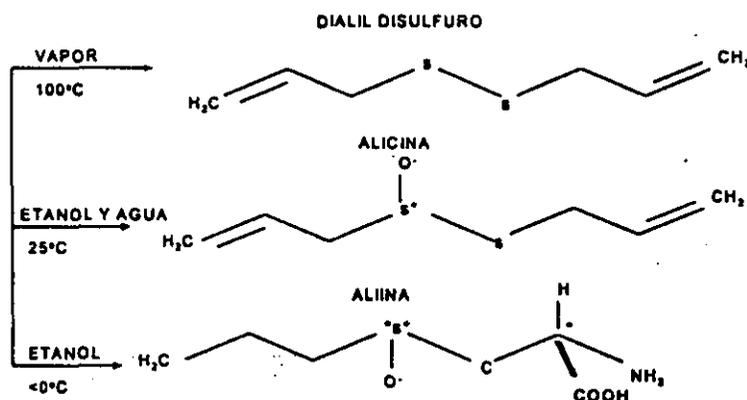
➤ La co-administración de antioxidantes como vitamina E y selenio disminuyen el daño renal inducido por GM (Ademuyiwa *et al.*, 1990).

Por otro lado, se ha estudiado el comportamiento de las enzimas antioxidantes en el riñón de animales tratados con GM. En estas condiciones, la actividad de la catalasa disminuye en el riñón de las ratas (Ramsammy *et al.*, 1985; 1986; 1987; 1989; Sandhya & Varalakshmi, 1997) al igual que la actividad de GPx en el corazón de los cobayos (Ozturk *et al.*, 1997). En cuanto a la actividad total de la SOD existen discrepancias ya que algunos autores han encontrado una baja actividad de esta enzima en el riñón de las ratas con GM (Ramsammy *et al.*, 1987; Sandhya & Varalakshmi, 1997) y otros han encontrado que la actividad de esta no difiere a la de los controles (Nakajima *et al.*, 1994; Ramsammy *et al.*, 1985; 1986). Sin embargo, no se han hecho estudios que comparen la actividad de las dos isomorfias de SOD (Cu,Zn-SOD y Mn-SOD).

4. El ajo

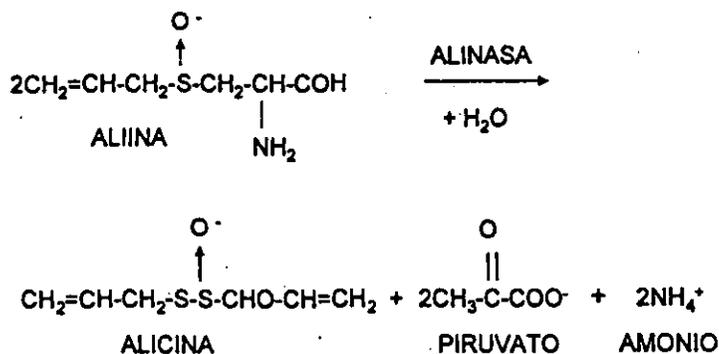
4.1 Componentes

El ajo (*Allium sativum*), es rico en compuestos azufrados y es uno de los vegetales que contiene niveles elevados de selenio (3.5 mg/g de peso fresco) (Block *et al.*, 1996). Los principales agentes activos del ajo son la alicina, el ajoene y el dialil disulfuro (compuestos sulfurados) pero también se han estudiado otros (Block, 1985). Se pueden obtener distintos compuestos dependiendo del procedimiento de extracción que se emplee con el ajo (Esquema 4).



Esquema 4. Compuestos sulfurados 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 metilaliltiosulfinato y el alilmetiltiosulfinato (Block, 1985). Dentro del bulbo del ajo, la aliina (inodora) es almacenada en las células mesofilicas, las cuales no contienen la enzima alinasa. Ésta se encuentra compartamentalizada dentro de la célula y sólo cuando se somete al ajo a un daño mecánico, la enzima entra en contacto con la aliina convirtiéndola en alicina y otros compuestos organosulfurados fuertemente olorosos (Block, 1985) (Esquema 5).



Esquema 5. Formación de alicina a partir de aliina por acción de la alinasa.

Al combinarse tres moléculas de alicina se producen dos moléculas de ajoene (Block, 1985; Augusti & Sheela, 1996). Estos compuestos sulfurados han sido estudiados para determinar qué papel juegan en las rutas metabólicas, en particular en las de detoxificación.

En otro estudio se comprobó la estabilidad térmica de los extractos de ajo. La actividad como atrapador de los radicales hidroxilo disminuyó sólo un 10% cuando se sometieron los extractos de ajo a una temperatura de cocción (Prasad *et al.*, 1996). Esta estabilidad térmica confiere al ajo una mayor versatilidad en su uso.

4.2 Propiedades antihipertensivas

Se ha descrito que el ajo (Rietz *et al.*, 1993) y algunos dipéptidos aislados y caracterizados en el extracto acuoso a partir de este (Suetsuna, 1998) inhiben a la enzima convertidora de angiotensina I (ECA). Esta enzima es importante en la regulación de la presión arterial ya que genera el octapéptido angiotensina II, el cual es un vasoconstrictor muy potente. Por otra parte, los extractos etanólicos del ajo activan a la sintasa de óxido nítrico (SON) *in vitro* (Das *et al.*, 1995a; 1995b; 1996), una enzima relevante en el mantenimiento de la presión sanguínea. También se ha observado que una dieta de ajo al 2%, similar a la usada en este trabajo, previene la hipertensión inducida por la inhibición crónica de la SON (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1998).

4.3 Propiedades antioxidantes

Las evidencias que apoyan las propiedades antioxidantes del ajo se resumen en el cuadro 7.

Otro aspecto 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.*, 1993a; 1993b) lo que abre la posibilidad de que algunos de los efectos del ajo se puedan deber no únicamente a su acción directa sobre los metabolitos implicados en las patologías sino a la modulación de la transcripción o bien a que podría modular el estado redox de la célula.

Cuadro 7. Evidencias que apoyan las propiedades antioxidantes del ajo

Evidencias *in vitro*

1. Los extractos etanólicos del ajo previenen la lipoperoxidación de las biomembranas (microsomas hepáticos), inducida a través de radicales libres a partir de ácido ascórbico (Horie *et al.*, 1989).
 2. Los extractos de ajo envejecido, cuyos principales componentes son la S-alil-cisteína y S-alil-mercaptocisteína, inhiben la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico producidas por el t-butil hidroperóxido en las fracciones microsomales del hígado (Imai *et al.*, 1994).
 3. La alicina, al parecer posee características de atrapante de los radicales hidroxilo (producto de la fotólisis del H₂O₂), ya que disminuye la cantidad de los aductos del ácido 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoico y previene la lipoperoxidación en las fracciones microsomales del hígado de manera dosis dependiente (Prasad *et al.*, 1995).
 4. Los extractos acuosos de ajo reaccionan con los radicales hidroxilo (producto de la reacción de Fenton), y así disminuyen la formación de complejos con la α -fenil-t-butil nitrona (Török *et al.*, 1994).
 5. Los extractos acuosos de ajo inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por Cu²⁺ (Lewin & Popov, 1994).
 6. Los compuestos organosulfurados del extracto envejecido de ajo, son eficaces para atrapar el H₂O₂ e inhibir lipoperoxidación (Ide *et al.*, 1996).
 7. Los extractos de ajo previenen la lipoperoxidación en los homogenados de hígado de conejo, inducida por los radicales hidroxilo de una manera dosis dependiente *in vitro* (Prasad *et al.*, 1996).
 8. En las células del endotelio vascular tratadas un extracto de ajo envejecido disminuye la liberación de EROs, 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 las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, aumentan en las células tratadas con el extracto de ajo, lo cual puede explicar la disminución de H₂O₂ en estos cultivos (Wei & Lau, 1998).
 9. En las células del endotelio vascular tratadas un extracto de ajo envejecido, existe un incremento dependiente de la dosis y del tiempo en las actividades de SOD y glutatión reductasa, así como de los niveles de glutatión, lo que sugiere que este extracto puede modular elementos enzimáticos y no enzimáticos del ciclo redox-GSH, además de la actividad de SOD (Geng & Lau, 1997).
 10. El sulfóxido de S-alil-cisteína disminuye los niveles del MDA e incrementa las actividades de las enzimas CAT y SOD en el hígado de las ratas diabéticas *in vivo* (Augusti & Sheela, 1996).
-

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La gentamicina (GM) es un antibiótico que pertenece a la familia de los aminoglicósidos y que es empleado en el tratamiento de algunas infecciones causadas por bacterias gramnegativas. Sin embargo, su efecto nefrotóxico representa un problema clínico serio, ya que se ha estimado que un 30% de los pacientes tratados con GM por más de 7 días muestran signos de nefrotoxicidad (Mathew, 1992).

Aunque existen nuevos agentes y menos tóxicos como las cefalosporinas de tercera generación, los aminoglicósidos siguen siendo los agentes antibacterianos más utilizados; lo que se debe a su bajo costo, su rápida acción bactericida, su amplio espectro de actividad especialmente contra bacterias gramnegativas y a su estabilidad química. Así mismo, se conoce muy bien su farmacología, toxicidad y propiedades terapéuticas (Ali, 1995). Por lo tanto, el valor de los aminoglicósidos en la práctica clínica aumentaría si se encontrara la manera de proteger al riñón de los efectos colaterales indeseables.

La farmacocinética, la patología y el patrón clínico del daño renal inducido por la GM se ha estudiado en el humano y en modelos animales; sin embargo, a pesar de que se conocen varios efectos bioquímicos de la GM, no está clara la secuencia de eventos de estas alteraciones ni se sabe cuál de ellos es responsable de las alteraciones glomerulares y tubulares características de la nefrotoxicidad por GM (Kacew & Bergeron, 1990). Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos que se ha postulado es la participación de las EROs (Walker & Shah, 1987; Yang *et al.*, 1995; Guidet & Shah, 1989; Walker & Shah, 1988; Nakajima *et al.*, 1994; Ali & Bashir, 1996).

Dadas las propiedades antioxidantes del polvo de ajo (Granados-Silvestre *et al.*, 1999; Rietz *et al.*, 1993), su bajo costo y su uso extendido, es atractivo estudiar su efecto terapéutico en el daño renal mediado por las EROs.

En este trabajo se planteó el uso del ajo en polvo, porque es una de sus formas de mayor consumo y debido a que se sabe que durante el proceso de deshidratación el polvo de ajo no pierde sus propiedades antioxidantes (Granados-Silvestre *et al.*, 1999; Rietz *et al.*, 1993) incluso a temperaturas elevadas (Prasad *et al.*, 1996).

IV. HIPÓTESIS

Dado que el polvo de ajo posee propiedades antioxidantes y que existen evidencias de que las especies reactivas de oxígeno participan en la nefrotoxicidad inducida por GM, es posible que:

1. Las EROs modifiquen la actividad y la cantidad renal de las enzimas antioxidantes, entre ellas la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD o bien que las defensas antioxidantes bajen y por lo tanto aumenten las EROs.
2. La alimentación con ajo prevenga o aminore el daño renal inducido por este aminoglicósido a través de un efecto antioxidante directo y/o mediante la modificación de la actividad y/o la cantidad de las enzimas antioxidantes, entre ellas la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD.

V. OBJETIVOS

1. Evaluar en las ratas con insuficiencia renal inducida por la gentamicina, las enzimas antioxidantes Mn-SOD y Cu,Zn-SOD en la corteza y médula la renal.
2. Estudiar el posible efecto protector del polvo de ajo al 2% sobre la nefrotoxicidad inducida por la GM y los posibles cambios en las isomorfias antes mencionadas.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

El p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminido, la xantina oxidasa, la xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT), la albúmina, el dietilditiocarbamato (DDC), la superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD) de eritrocitos bovinos, la leupeptina, la pepstatina, la aprotinina, la acrilamida, la bisacrilamida, la glicina, el Tris-HCl, el persulfato de amonio, el glicerol, el SDS, el ditiotreitól, el TEMED (tetrametiletilendiamina), el azul de Coomassie y el azul de bromofenol fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La gentamicina (GM) fue de Schering-Plough (México, D.F.). Usamos la presentación comercial Garamicina[®] en solución inyectable de 160 mg/2ml. Los anticuerpos anti-Mn-SOD y anti-Cu,Zn-SOD usados en el inmunoensayo "Western", fueron de Stressgen (Victoria, Canadá). Para las determinaciones del nitrógeno de la urea y la creatinina se usaron los estuches de Farmacéuticos Lakeside (México, D.F.); para la determinación de la lipoperoxidación se empleó un estuche de Calbiochem (San Diego, CA); para determinar el contenido de la GM se empleó un estuche de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) y para el inmunoensayo "Western" se usó un estuche de quimioluminiscencia de Amersham, Life Science (Buckinghamshire, England). Las sales de fosfatos para los amortiguadores, el ácido tricloroacético, el citrato de sodio, el EDTA, el carbonato de sodio, el cloruro cúprico, el sulfato de amonio y el ácido acético glacial fueron de J.T. Baker (México, D.F.). El metanol grado HPLC fue de Mallinckrodt (México, D.F.). El polvo de ajo fue de McCormick (México, D.F.).

2. Dieta

Como dieta control se utilizó alimento comercial para rata (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc., Richmond, IN, USA). La dieta con ajo se preparó usando alimento control mezclado con el polvo de ajo al 2% (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1998). El polvo de ajo se obtiene a partir del ajo fresco, el cual es triturado y deshidratado en unas tolvas. En el proceso de deshidratación el ajo no pierde sus propiedades antioxidantes como se demuestra en otros trabajos (Granados-Silvestre *et al.*, 1999; Rietz *et al.*, 1993). Además, se ha visto que la propiedad de los extractos de ajo para atrapar los radicales hidroxilo disminuye solo un 10% cuando estos se someten a temperatura de cocción (Prasad *et al.*, 1996). En este trabajo me refiero a la dieta con polvo de ajo al 2% simplemente como ajo.

3. Animales

Este trabajo se realizó en ratas macho de la cepa Wistar de 150 a 200 g de peso, obtenidas del bioterio de la Facultad de Química, UNAM.

4. Diseño experimental

Dos semanas antes del tratamiento con la GM, las ratas se alimentaron con una dieta control y con una dieta de ajo al 2%. Las ratas se dividieron en 4 grupos: 1) CONTROLES (CT), inyectadas con solución salina y alimentadas con una dieta normal; 2) GENTAMICINA (GM), tratadas con GM y alimentadas con una dieta normal; 3) AJO (A), inyectadas con solución salina y alimentadas con una dieta de ajo y 4) GENTAMICINA + AJO (GM+A), tratadas con gentamicina y alimentadas con una dieta de ajo. La GM se administró subcutáneamente cada 12 h durante 6 días en una dosis de 75 mg de GM/Kg de peso (Stratta *et al.*, 1994). Los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de la orina de 24 h y se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con libre acceso al alimento y al agua. Los animales se pesaron antes de iniciar el tratamiento con GM y los días de recolección de la orina (día 0, día 3, día 5 y día 7). Doce horas después de la última inyección, los animales se sacrificaron por decapitación para obtener la sangre y los riñones.

4.1 Determinaciones

- En la orina se determinó la excreción de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), de la proteína total y de la creatinina.
- En el plasma se determinó la concentración de la creatinina y del nitrógeno de la urea.
- Uno de los riñones se perfundió y en ambos riñones se separaron la corteza y la médula para las siguientes determinaciones:

□ Riñón sin perfundir

- ➔ En la corteza se determinó el contenido de la GM y la cantidad de proteína de Mn-SOD y de Cu,Zn-SOD y se realizó el análisis histológico.
- ➔ En la médula se determinó la cantidad de proteína de Mn-SOD y de Cu,Zn-SOD.

□ Riñón perfundido

- ➔ En la corteza se determinó la cantidad de malondialdehído (MDA) + 4-hidroxinonenal (4-HNE) y la actividad de Mn-SOD y de Cu,Zn-SOD.
- ➔ En la médula, se determinó la actividad de Mn-SOD y de Cu,Zn-SOD.

5. Métodos empleados

5.1 Proteína total en la orina

Se determinaron por el método turbidimétrico con ácido tricloroacético (TCA) (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1999). Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente 1 ml de orina (diluida 1:5 con solución salina) con 250 μ l de TCA al 12.5% y se leyó la absorbencia a 420 nm. Se preparó un blanco para cada muestra que contenía 1 ml de orina diluida y 250 μ l de solución salina. Las absorbencias se interpolaron en una curva estándar con un intervalo de 0.04 a 0.8 mg/ml, partiendo de una solución de albúmina sérica bovina al 0.1%. Los datos se expresan en mg de proteína/24 h.

El aumento en la excreción urinaria de proteína puede reflejar el daño glomerular o tubular (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1995a).

5.2 Actividad de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en la orina

La actividad de la NAG se midió usando un ensayo que emplea p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminido como sustrato (Jung *et al.*, 1991). Se colocaron 100 μ l de orina en un tubo que contenía 750 μ l de amortiguador de citratos 50 mM (pH 4.4) y 250 μ l de sustrato en una concentración final de 6.8 mM. Para cada muestra se preparó un blanco con orina y amortiguador de citratos 50 mM (pH 4.4) y simultáneamente se preparó un blanco de comparación que contenía amortiguador de citratos 50 mM (pH 4.4), sustrato y agua; todos los tubos se incubaron durante 15 min a 37°C. En este método, la NAG libera el p-nitrofenol del sustrato el cual se midió espectrofotométricamente a 405 nm (Wellwood *et al.*, 1976a). Bajo estas condiciones, la producción de p-nitrofenol fue lineal en relación con el tiempo y la cantidad de orina. Las absorbencias obtenidas se interpolaron en una curva estándar de p-nitrofenol 0.6 mM en el intervalo de 4.68 a 150 nM. Los datos se expresan en U de NAG/24 horas. Una unidad de NAG se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol en 15 min y a 37°C a partir de 6.8 mM p-nitrofenil N-acetil- β -glucosaminido en un amortiguador de citratos 50 mM (pH 4.4). La excreción urinaria de las enzimas lisosomales como la NAG, ha sido empleada como un indicador del daño en el túbulo proximal (Patel *et al.*, 1975; Wellwood *et al.*, 1976b).

5.3 Histología

Después de sacrificar las ratas, se extrajeron los riñones inmediatamente y se obtuvo una rebanada de la corteza, la cual se fijó en 1 ml de una solución de formaldehído al 10%. Posteriormente, este corte se deshidrató gradualmente en alcohol y luego se embebió en parafina. Con un microtomo se obtuvieron cortes de 3 μm de grosor y se tiñeron con eosina/hematoxilina.

La cuantificación del daño histológico se determinó usando un analizador de imágenes de Leica Qwin (Cambridge, England). Se realizó el perfil histológico de 50 túbulos proximales por rata, seleccionados al azar (4-5 ratas por grupo experimental). Para ello, se midió el área total (μm^2) y el área ocupada por las células epiteliales con alteraciones histológicas como inflamación, vacuolización citoplásmica, descamación y necrosis. De esta manera, se calculó el porcentaje del área tubular afectada.

5.4 Creatinina en el plasma y en la orina

El plasma y la orina se desproteinizaron previamente con TCA al 12.5%, así la creatinina se determinó espectrofotométricamente mediante la reacción de Jaffé, utilizando un estuche comercial. En esta reacción, la creatinina forma un complejo colorido con el picrato en un medio alcalino. El producto formado absorbe a 520 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra. Se incubó 1 ml de plasma y 1 ml de orina (diluida 1:50 con agua) con 1 ml de ácido pícrico 35 mM en NaOH 1.6 M en una proporción 1:1, durante 20 minutos a temperatura ambiente. De manera simultánea y bajo las mismas condiciones, se preparó un blanco que contenía 0.5 ml de agua y 0.5 ml de TCA al 12.5% (con el que se calibró el aparato) y un estándar de creatinina de 2 mg/dl. Se leyó la absorbencia a 520 nm.

La cantidad de creatinina presente en las muestras de orina y de plasma se obtuvo tomando en cuenta la absorbencia del estándar de creatinina cuya concentración es de 2 mg/dl. Los datos de creatinina en plasma se expresan como mg de creatinina/dl. Con los datos de creatinina en plasma y en orina, se calculó la depuración de la creatinina usando la siguiente fórmula: $(U_{\text{CREA}} \cdot VU) / (P_{\text{CREA}} \cdot 1440)$. U_{CREA} es la concentración de creatinina en la orina, expresada en mg/dl; VU es el volumen urinario de 24 h, expresado en ml; P_{CREA} es la concentración de creatinina en el plasma sanguíneo, expresada en mg/dl y 1440 son los minutos que hay en 24 h. La depuración de la creatinina se expresó en ml/min.

La depuración de la creatinina se emplea como un marcador para evaluar la función renal, ya que es una manera de medir la velocidad de filtración glomerular (Schor *et al.*, 1981).

5.5 Nitrógeno de la urea en el plasma sanguíneo (BUN)

La concentración de la urea en el plasma sanguíneo se midió espectrofotométricamente. En este método, la urea presente en la muestra es hidrolizada por la ureasa a amonio y CO₂. Por otro lado, en una reacción acoplada el α -cetoglutarato y el NADH presentes en el medio, reaccionan utilizando el amonio producido por la ureasa, convirtiendo el α -cetoglutarato a L-glutamato por la glutamato deshidrogenasa. El consumo del NADH disminuye la absorbencia a 340 nm y esta disminución es directamente proporcional a la cantidad de urea presente en la muestra. Se colocaron en una celda de cuarzo 10 μ l de plasma y 1 ml de una mezcla de reacción que contenía ureasa, α -cetoglutarato, NADH y glutamato deshidrogenasa. La reacción se siguió a 340 nm con lecturas cada 30 seg durante 2.5 min. En las mismas condiciones se incluyó un blanco que contenía sólo la mezcla de reacción y un estándar de urea de 80 mg/dl. Se calculó la diferencia de absorbencias a los 0.5 min menos la absorbencia a los 2.5 min para el blanco, el estándar y las muestras. La diferencia en la absorbencia del blanco fue restada a la diferencia de absorbencias del estándar y de las muestras. Con estos valores y tomando en cuenta la absorbencia del estándar de urea de 80 mg/dl, se obtuvo la concentración de la urea (mg/dl) en el plasma sanguíneo. Finalmente la cantidad del nitrógeno de la urea se obtuvo dividiendo la concentración de la urea en el plasma sanguíneo (expresada en mg/dl) entre 2.14 que son los átomos de nitrógeno en una molécula de urea. Los datos se expresan en mg de BUN/dl.

Un aumento en los niveles circulantes de nitrógeno de urea, puede ser consecuencia de una disminución en la velocidad de filtración glomerular (Schor *et al.*, 1981).

5.6 Lipoperoxidación en la corteza renal

Se determinó el contenido de malondialdehído (MDA) y de 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) a través de un ensayo colorimétrico empleando un estuche comercial de Calbiochem®. Se pesaron 50 mg de corteza renal perfundida con solución salina y se homogeneizaron en 0.95 ml de una solución de Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) con un Politrón. El extracto se centrifugó a 3,000 x g por 10 min a 4°C. Se incubaron 100 μ l de este homogeneizado por 40 min a 45°C, en un tubo que contenía 325 μ l del reactivo R1 (N-metil-2-fenilindol) diluido con metanol grado

HPLC en una proporción de 3:1 respectivamente y 75 μ l del reactivo R2 (ácido metanosulfónico). Al término de la incubación, los tubos se enfriaron por 5 min en hielo, se centrifugaron a 13,500 rpm a 4°C durante 10 min y se leyó la absorbencia a 586 nm inmediatamente después. Se incluyó un blanco que contenía los mismos reactivos pero en lugar del homogeneizado contenía 100 μ l de la solución de Tris-HCl 20 mM (pH 7.4). En estas condiciones, el reactivo R1 (N-metil-2-fenilindol) reacciona con el MDA y el 4-HNE a 45°C. La condensación de una molécula de MDA o de 4-HNE con dos moléculas del reactivo R1 lleva a la formación de un cromóforo estable con absorbencia máxima a 586 nm. Las absorbencias obtenidas se interpolaron en una curva estándar en un intervalo de 0-20 μ M hecha a partir de una solución de MDA y de 4-HNE 10 mM. Los datos se expresan como nmoles de MDA + 4-HNE/mg de proteína de la corteza renal.

5.7 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

a) SOD total. La actividad de la SOD total se determinó por la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) (Oberley & Spitz, 1984). Se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración de 168 U/L y también una mezcla de reacción que contenía en concentración final: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μ M, albúmina sérica bovina 0.006% y carbonato de sodio 49 mM. Se colocaron 2.45 ml de la mezcla de reacción en unos tubos de ensayo y se mantuvieron a una temperatura de 27°C. Posteriormente se adicionaron 0.5 ml del homogeneizado de corteza o de médula, diluido 1:100 con agua e inmediatamente después la reacción se inicio con la adición de 50 μ l de la solución de xantina oxidasa. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero sin la solución de xantina oxidasa. De manera simultánea se preparó un blanco de comparación el cual contenía xantina oxidasa pero sin homogeneizado. Todos los tubos se incubaron 30 min, al término de esta incubación se adicionó 1 ml de cloruro cúprico 0.8 mM y se leyó la densidad óptica a 560 nm. Bajo estas condiciones, la reducción del NBT cae en el intervalo lineal con concentraciones crecientes del enzima pura de Cu,Zn-SOD (Sigma Chemical Co.).

Los datos se expresaron como U de SOD/mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50 % la reducción del NBT.

b) SOD de manganeso (Mn-SOD). Los homogeneizados de la corteza y de la médula se incubaron previamente con dietilditiocarbamato (DDC) 50 mM durante 1 h a 30°C (100 μ L de homogeneizado + 100 μ L de DDC 100 mM) para inactivar la isomorfa Cu,Zn-SOD. Posteriormente el homogeneizado tratado con el DDC se dializó realizando dos cambios de 400 volúmenes en amortiguador de fosfatos 5 mM-EDTA 0.1 mM (pH 7.8) durante 3 h (Iqbal & Whitney, 1991). Para determinar la actividad de la Mn-SOD, se siguió el mismo procedimiento que para la SOD total, sólo que los homogeneizados de corteza y de médula tratados como se mencionó antes se diluyeron con agua 1:50. Los datos se expresaron en U de SOD/mg de proteína.

c) SOD de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD). La actividad de la Cu,Zn-SOD se obtuvo restando la actividad de la Mn-SOD de la actividad de la SOD total. Los resultados se expresaron como U de SOD/mg de proteína.

5.8 Inmunoensayo "Western"

Se homogeneizaron 100 mg de corteza y de médula en 300 μ l de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) que contenía un cóctel de antiproteasas (leupeptina 5 μ g/ml, pepstatina 7 μ g/ml y aprotonina 5 μ g/ml) y EDTA 1 mM. Se midió el contenido de proteína en los homogeneizados por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y se hicieron alícuotas con una concentración de 5 μ g/ μ l para cada muestra.

Se prepararon dos geles de acrilamida en un soporte Mighty Small™ SE 245 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA) con el gel de resolución al 12% y el gel concentrador al 5% según el método de Laemmli (Laemmli, 1970), los cuales se montaron en una cámara de electroforesis Mighty Small™ SE 250 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA). En tubos Eppendorf, se desnaturalizaron durante 1 min en agua hirviendo 6 μ l del homogeneizado (5 μ g/ μ l) con 6 μ l de una solución desnaturalizante (Tris-HCl 50 mM pH=6.8, ditiotreitol 100 mM, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.1% y glicerol al 10%). El contenido de los tubos se colocó en cada uno de los pozos de los geles de acrilamida y se corrió la electroforesis durante 2 h a 100 V. Uno de los geles se tiñó durante 2 h con azul de Coomassie como control de la cantidad de proteína en cada uno de los pozos. Las proteínas del otro gel se transfirieron durante 2 h a 400 mA a una membrana de nitrocelulosa de Hybond ECL, Amersham, Life Science (Buckinghamshire, England) con una cámara de transferencia

Mighty Small™ TE 22 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA). Para comprobar que la transferencia de proteínas fue completa, al final de ésta, el gel se tiñó durante 2-h con azul de Coomassie. Los geles teñidos se destiñeron con una solución de metanol-agua en una proporción 1:1 y ácido acético. La ausencia de bandas indica una transferencia completa.

Para el inmunoensayo "Western", se bloquearon las membranas con leche *Svelty* al 5% en fosfato de sodio dibásico 80 mM, fosfato de sodio monobásico 20 mM y NaCl 100 mM (PBS) pH 7.5 durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación. Después se realizaron dos lavados de 20 min con PBS y se incubaron las membranas con agitación durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos comerciales anti-Cu,Zn-SOD y anti-Mn-SOD. Después de otros dos lavados de 20 min con PBS, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces más con PBS durante 20 min. Los anticuerpos unidos a la membrana se observaron usando un sistema de detección que emplea quimioluminiscencia.

Bajo estas condiciones, la intensidad de las manchas fue lineal con concentraciones crecientes de proteína (5-100 µg de proteína). La cantidad de proteína empleada en el ensayo (30 µg) cae dentro de este intervalo.

Los datos de densitometría se obtuvieron usando un analizador de imágenes Eagle Eye de Stratagene. Este programa da los resultados en pixel (fotones captados) y los datos se expresan como porcentaje tomando controles como 100%.

5.9 Contenido de la gentamicina en la corteza renal

La GM se midió en homogeneizado de corteza renal con un inmunoensayo de fluorescencia polarizada, empleando el sistema TDX-GM de los laboratorios Abbot (Abbott Park, IL). El homogeneizado renal se diluyó en un amortiguador TDX para obtener concentraciones entre 3 y 7 µg/ml. El porcentaje de recuperación de la GM del homogeneizado renal fue de $98.2 \pm 7.8\%$. El contenido de GM en la corteza renal se expresó como µg de GM/mg de proteína.

Los resultados se interpolaron en una curva obtenida a partir de los siguientes estándares de GM: 0.0, 0.5, 1.5, 3.0, 6.0 y 10.0 µg/ml.

6. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. Los datos se analizaron con el programa Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante ANOVA y mediante comparaciones múltiples de Bonferroni. Los datos obtenidos en el contenido renal de la GM y de la histología se analizaron estadísticamente mediante una prueba de la *t de Student* no pareada. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

1. Peso corporal y volumen urinario

La figura 1A muestra que la GM y el ajo no tuvieron un efecto sobre el peso corporal de las ratas, ya que este no cambió estadísticamente con respecto a los controles. El día 7 del tratamiento la GM indujo un incremento significativo en el volumen urinario (15.6 ± 6.1) comparado con el grupo control (5.6 ± 3.8). El ajo no evitó este incremento ya que el volumen urinario en el grupo GM+A fue de 19.6 ± 5.6 (Figura 1B).

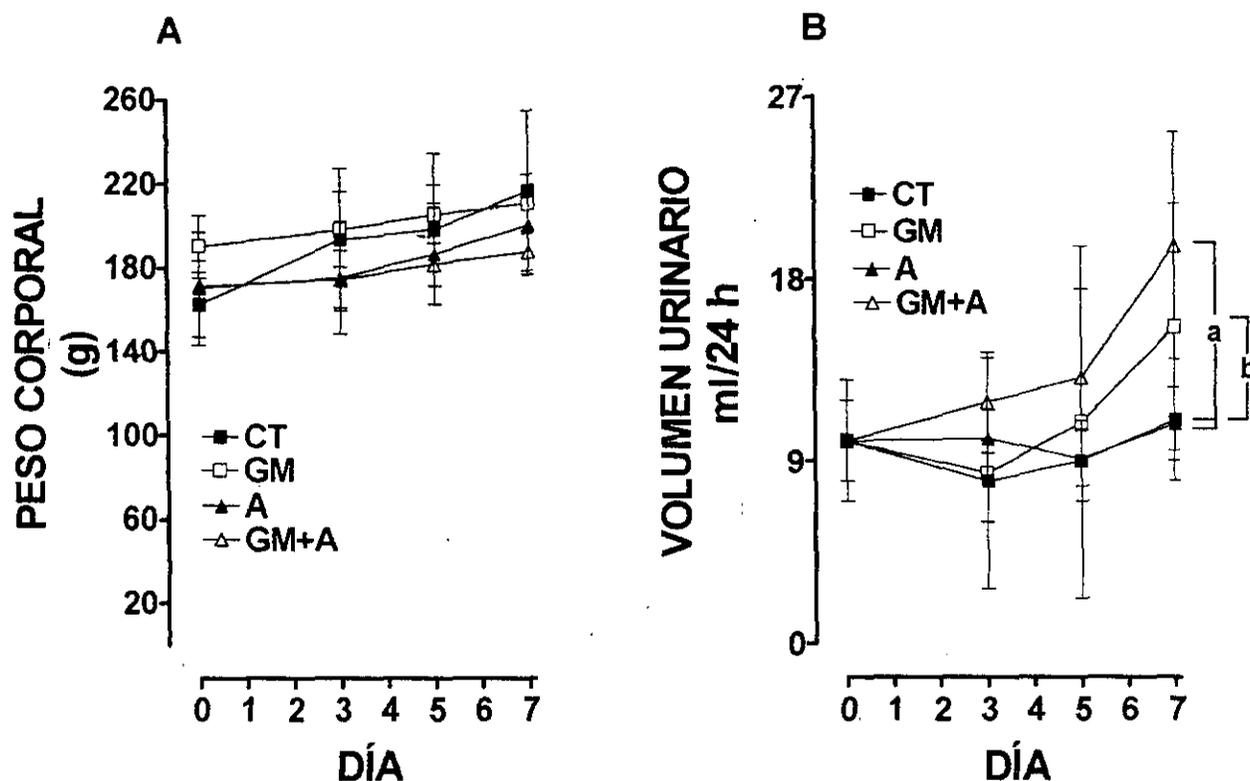


Figura 1. Efecto del ajo y de la GM sobre (A) el peso corporal y (B) el volumen urinario. $n=7-8$ para cada punto. a = $P<0.001$; b = $P<0.01$

2. Alteraciones tubulares

2.1 Excreción de la NAG y de la proteína en orina

En las figuras 2 A y B se observa que el tratamiento con GM indujo un incremento significativo en la excreción urinaria de NAG y de la proteína a partir del día 3 de tratamiento; en el día 7 se observó el mayor incremento de casi 10 veces para la NAG y de 5 veces para la

proteína. El ajo previno parcialmente el incremento en la excreción urinaria de la NAG y de la proteína (grupo GM+A).

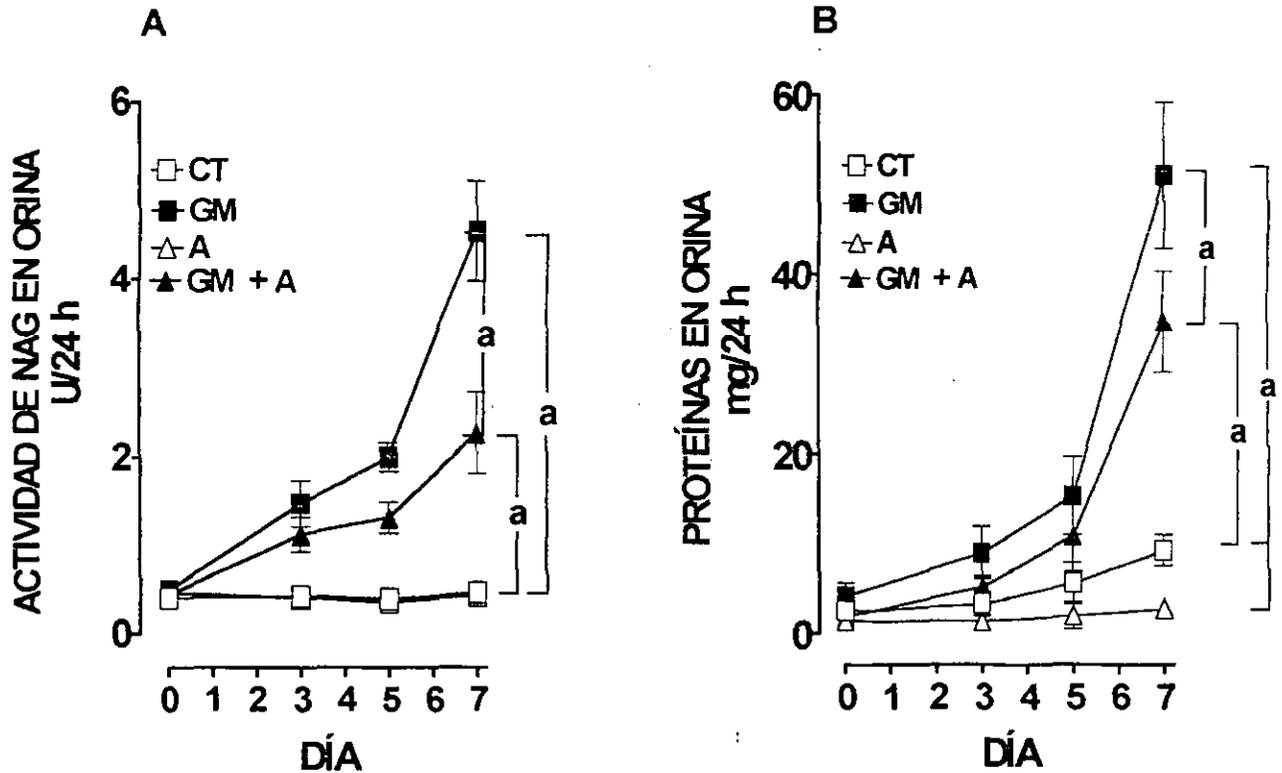


Figura 2. Efecto del ajo y de la GM sobre la excreción urinaria de (A) NAG y (B) proteína en orina. $n=6-8$ para cada punto. $a = P < 0.001$

2.2 Análisis histológico

En la figura 3 se observa que las ratas tratadas con GM muestran inflamación, vacuolización y necrosis en las células epiteliales del túbulo proximal (Figura 3 B) comparadas con las ratas del grupo control (Figura 3 A). En las ratas alimentadas con ajo, el daño tubular inducido por la GM disminuyó significativamente (Figura 3 C). No se observaron alteraciones histológicas en los túbulos proximales de las ratas alimentadas con ajo (Datos no mostrados).

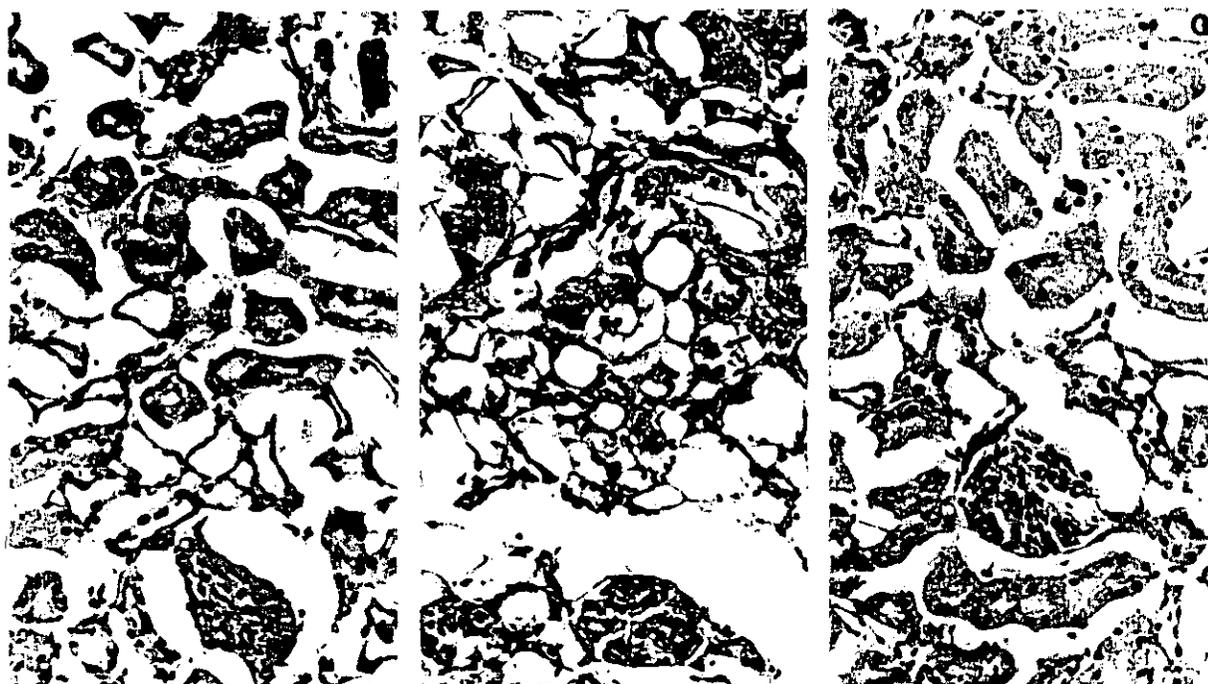
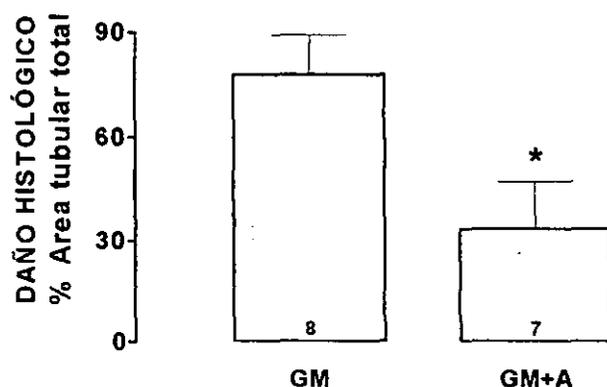


Figura 3. Microscopía de luz de los cortes de la corteza renal de (A) las ratas control (CT), (B) las ratas tratadas con GM por 6 días (GM) y (C) las ratas tratadas con GM y alimentadas con ajo (GM+A). En la figura B la necrosis se indica con flechas y la descamación de las células epiteliales del túbulo proximal con cabezas de flecha. H&E. (A) y (B) 100x; (C) 200x.

En la figura 4 se puede observar que las ratas tratadas con GM presentan un mayor porcentaje de área tubular dañada (78.2 ± 11.3) comparada con el área tubular dañada en las ratas tratadas con GM y alimentadas con ajo (33.5 ± 14).



* $P < 0.0001$

Figura 4. Efecto del ajo sobre el daño histológico inducido en la nefrotoxicidad por GM a los 7 días. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras.

3. Alteraciones glomerulares

3.1 Creatinina sérica y depuración de la creatinina

La nefrotoxicidad inducida por la GM se hizo evidente por el incremento de 2.5 veces de la creatinina en el plasma sanguíneo de las ratas tratadas con el antibiótico durante 6 días, comparadas con los controles (CT: 0.4 ± 0.09 y GM: 0.97 ± 0.28 ; Figura 5 A). El aumento en los niveles de creatinina en el plasma sanguíneo es consecuencia de la disminución en la depuración de creatinina, ya que en las ratas tratadas con GM la depuración disminuyó a 0.22 ± 0.08 comparada con la de las ratas control de 0.49 ± 0.13 (Figura 5 B). En las ratas tratadas con GM y alimentadas con ajo (GM+A), el efecto sobre el nivel de creatinina sérica se previno parcialmente, mientras que en la depuración de creatinina se previno totalmente, a pesar de que se observa una disminución que estadísticamente no es diferente (Figura 5 A y B).

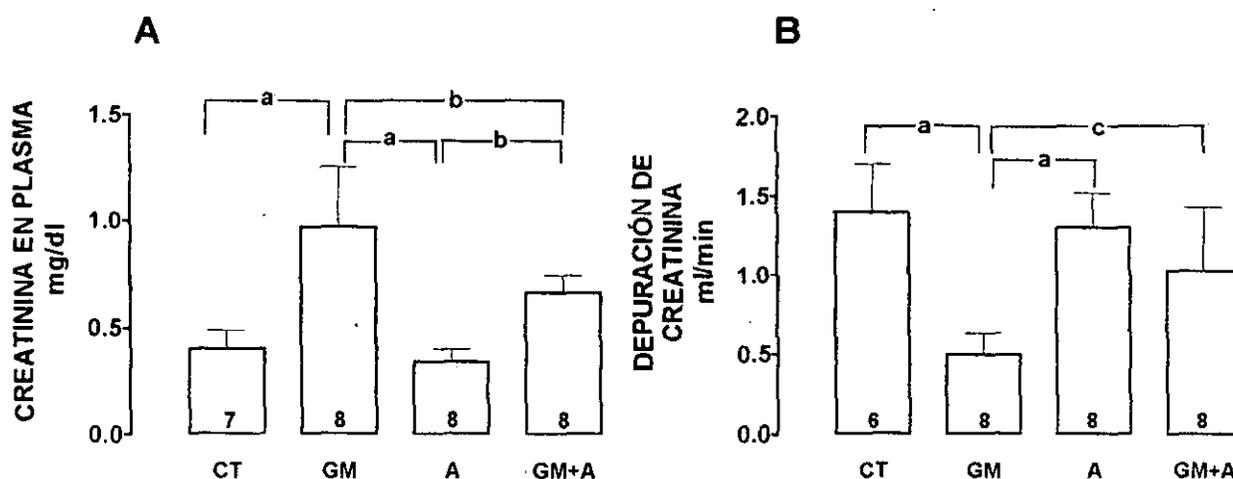


Figura 5. Efecto del ajo sobre la nefrotoxicidad inducida por la GM a los 7 días. (A) Creatinina en el plasma sanguíneo y (B) Depuración de la creatinina. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras. a = $P < 0.001$; b = $P < 0.01$; c = $P < 0.05$

3.2 Nitrógeno de urea (BUN)

En la figura 6 se observa que la GM incrementó 3.5 veces el nivel del BUN en el plasma sanguíneo de las ratas tratadas con el antibiótico durante 6 días, comparadas con los controles (CT: 16.7 ± 1.6 y GM: 57.8 ± 26.5). El tratamiento con ajo (GM+A), previno parcialmente el incremento encontrado en las ratas tratadas con GM (GM+A: 35.8 ± 11.4).

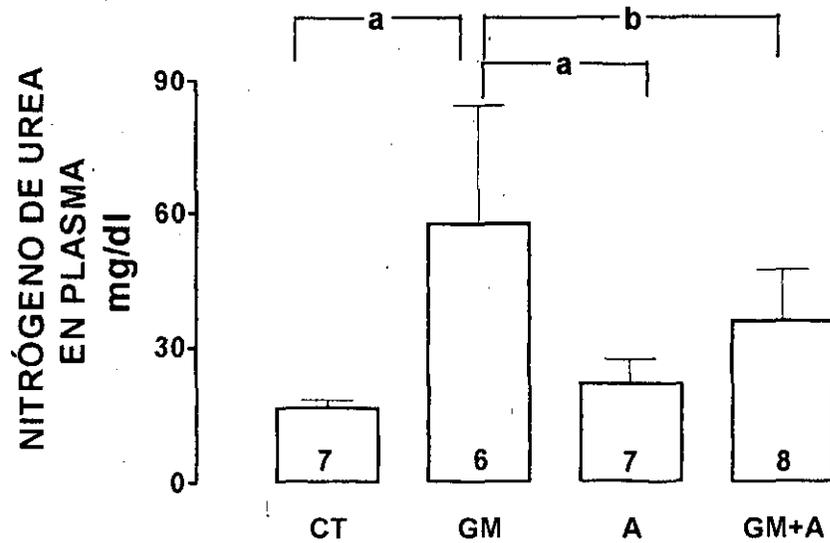


Figura 6. Efecto de la GM y del ajo sobre la concentración plasmática del nitrógeno de la urea en el día 7. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras. a = $P < 0.001$; b = $P < 0.05$

4. Lipoperoxidación

En la figura 7 se observa un aumento de 4 veces en la lipoperoxidación en las ratas tratadas con GM (1.33 ± 0.3) comparada con las ratas control (0.34 ± 0.08). También se observa un efecto protector del ajo, sobre la producción de productos finales de lipoperoxidación ya que en el grupo de GM+A el contenido de MDA y de 4-HNE fue muy similar al del grupo control y a la del grupo con ajo.

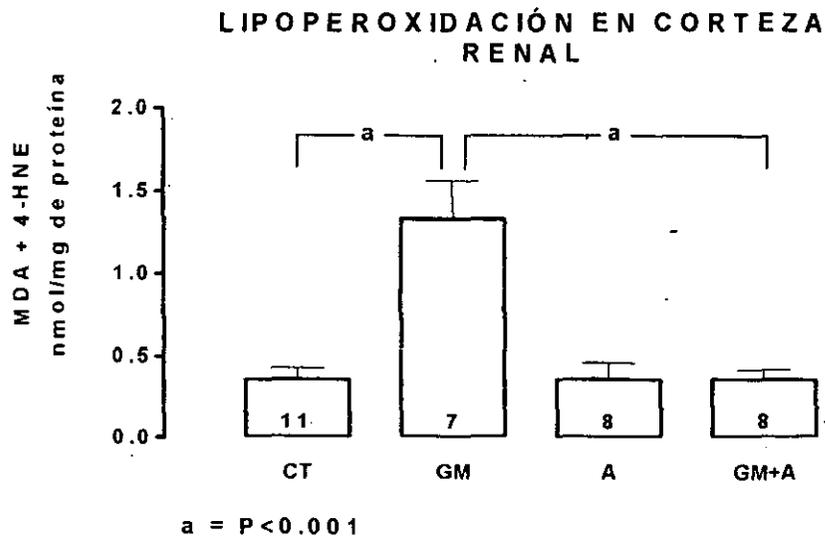


Figura 7. Efecto del ajo sobre el contenido de MDA y de 4-HNE en la corteza renal de las ratas tratadas con GM el día 7. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras.

5. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

5.1 En corteza

El tratamiento durante 6 con GM disminuyó la actividad de la SOD total en la corteza renal, de 18.8 ± 0.7 a 14.2 ± 0.3 (Figura 8 A). Esta disminución se debe a la actividad de la Mn-SOD, que baja de 6.3 ± 0.5 a 1.7 ± 0.2 (Figura 8 B), ya que la actividad de la Cu,Zn-SOD fue muy similar en los cuatro grupos estudiados (Figura 8 C). El ajo bloqueó la disminución en la actividad de la SOD total (18.7 ± 0.9) debido a que bloqueó la disminución en la actividad de la Mn-SOD (5.8 ± 0.4) (Figura 8 A y B).

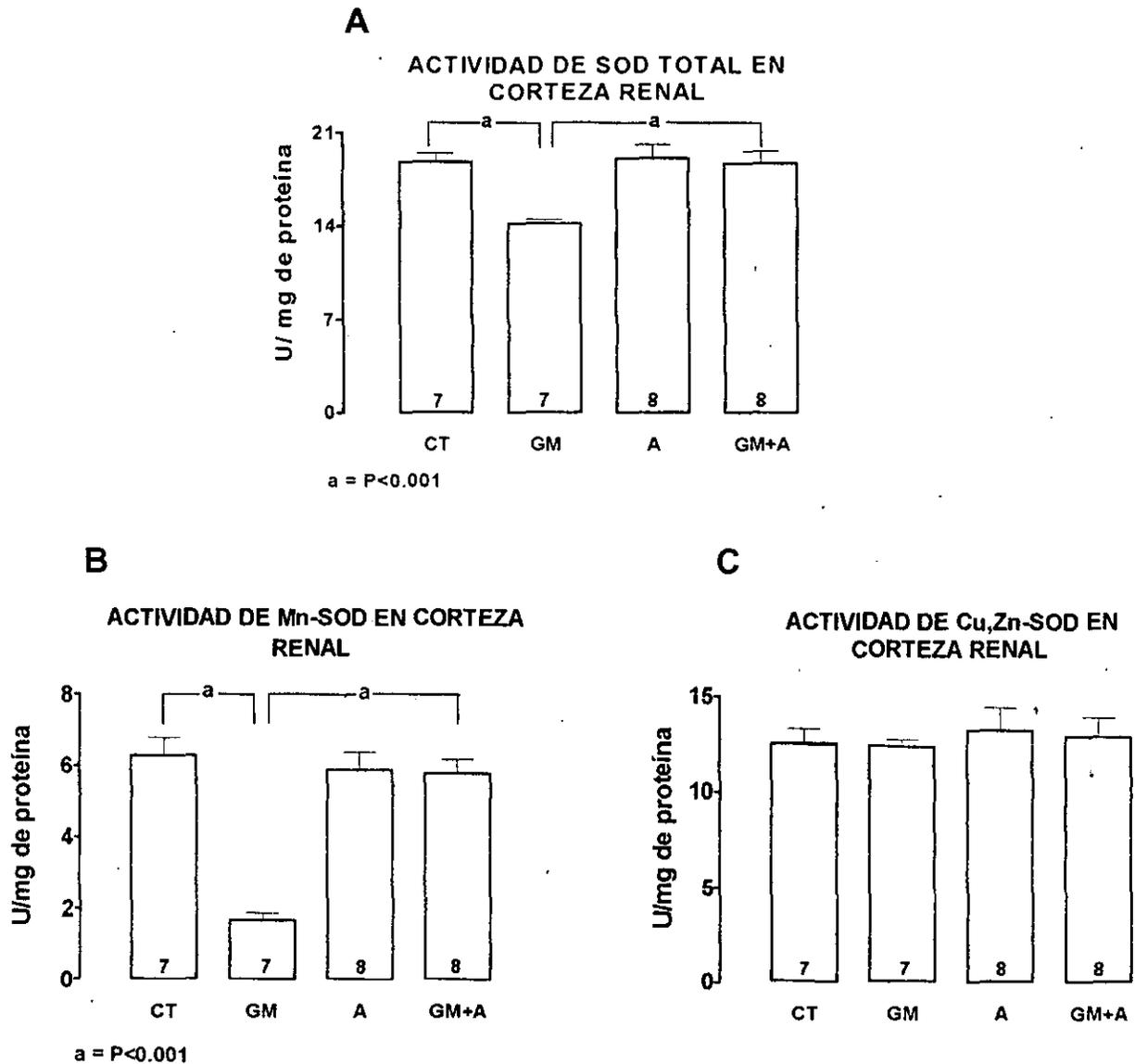


Figura 8. Efecto del ajo sobre la actividad de (A) la SOD total, (B) la Mn-SOD y (C) la Cu,Zn-SOD en la corteza de las ratas tratadas con GM durante 6 días. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras

5.2 En médula

En la figura 9 se observa que la actividad de la SOD total fue muy similar en la médula renal de los cuatro grupos estudiados (Figura 9 A), debido a que las actividades de la Mn-SOD y de la Cu,Zn-SOD no cambiaron en los cuatro grupos estudiados (Figura 9 B y C).

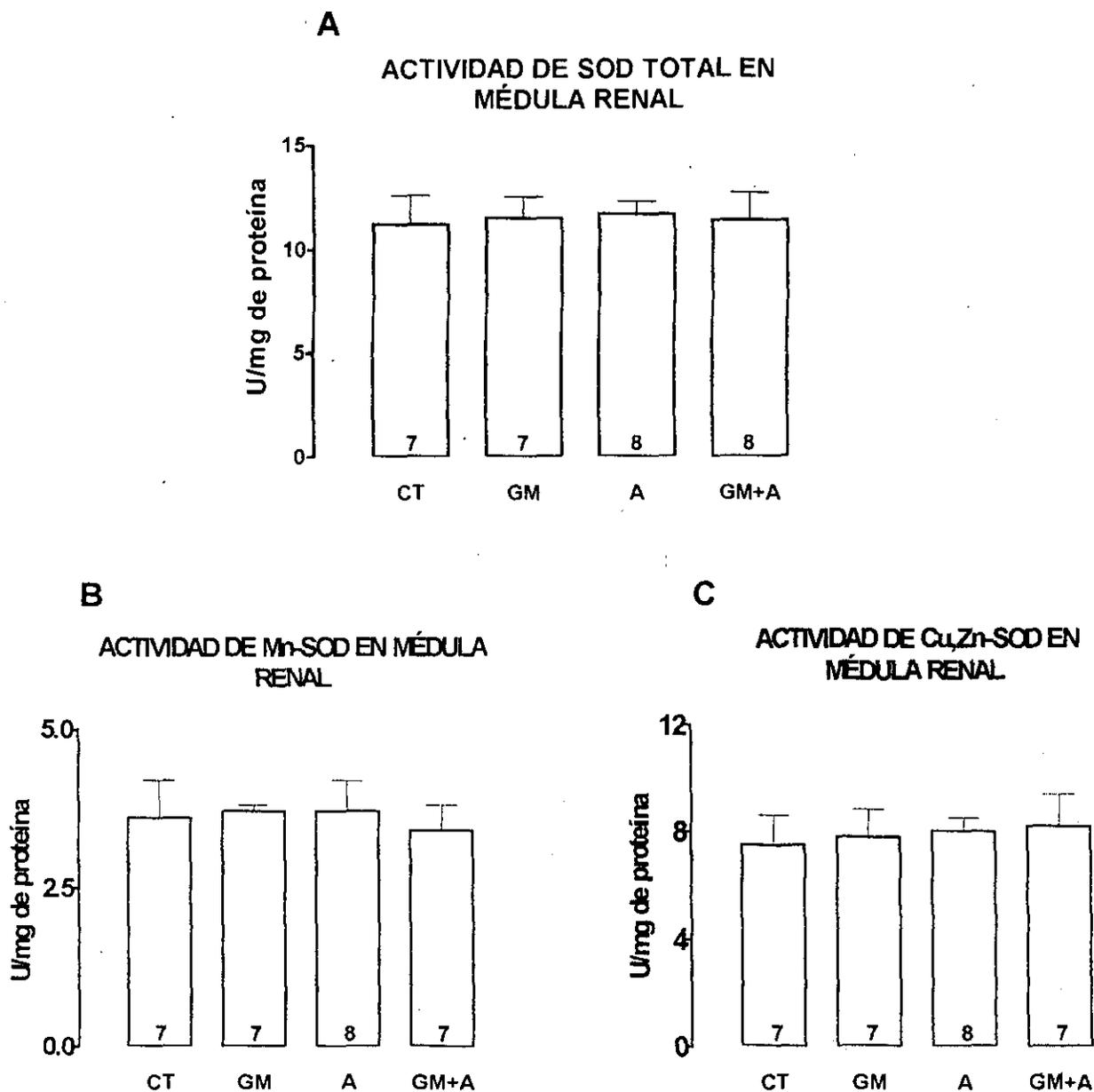


Figura 9. Efecto del ajo sobre la actividad de (A) la SOD total, (B) la Mn-SOD y (C) la Cu,Zn-SOD en la médula de las ratas tratadas con GM durante 6 días. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras.

6. Inmunoensayo "Western" de la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD

6.1 En corteza

La GM y el ajo no modificaron la cantidad de la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD detectada inmunológicamente en la corteza renal en ninguno de los grupos estudiados (Figura 10).

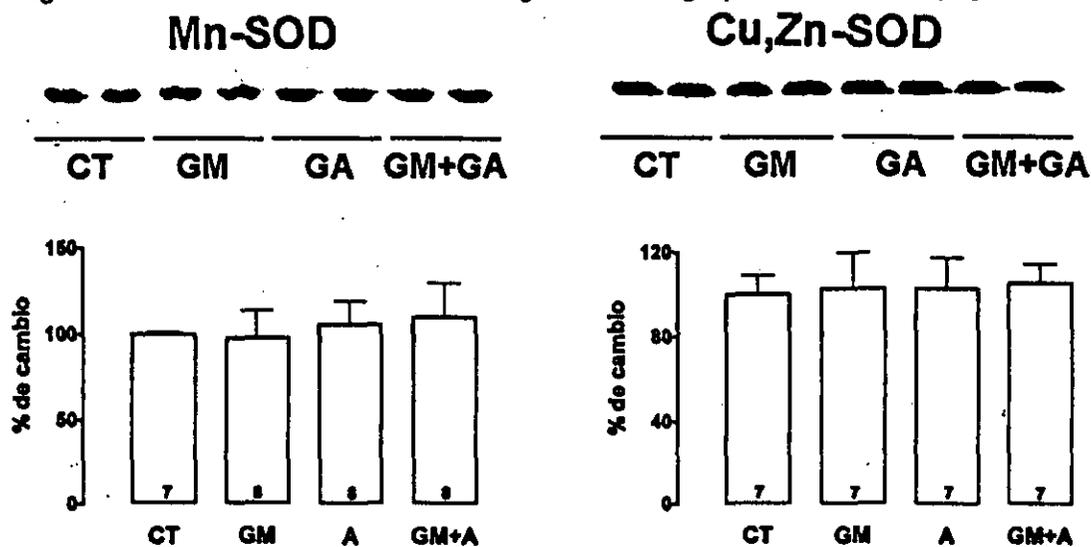


Figura 10. Efecto de la GM y del ajo sobre la cantidad de proteína de la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD detectada inmunológicamente en la corteza renal. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras.

6.2 En médula

La GM y el ajo no modificaron la cantidad de la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD en médula renal en ninguno de los grupos estudiados (Figura 11).

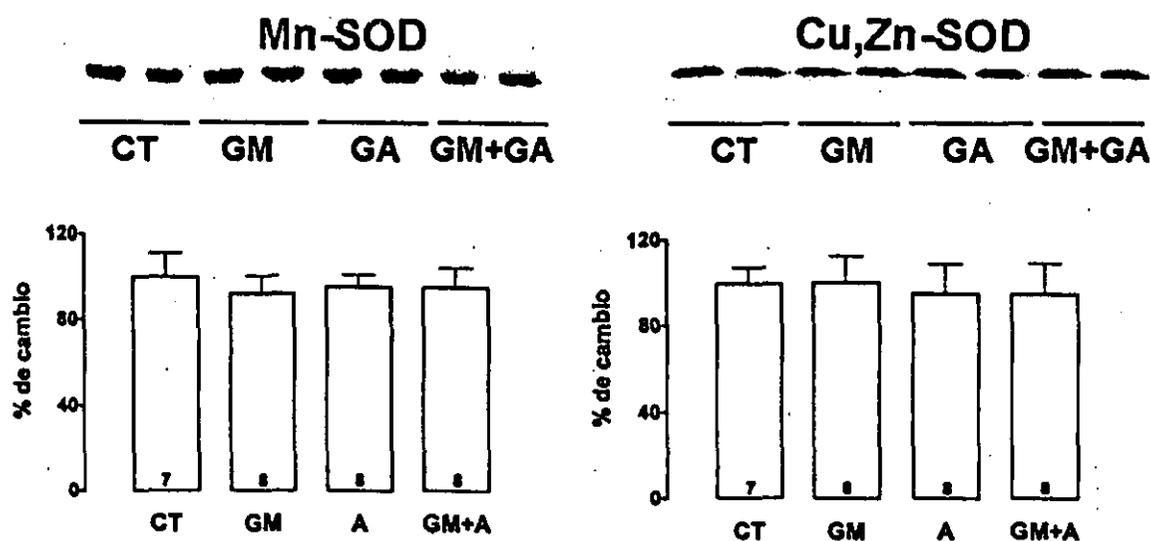


Figura 11. Efecto de la GM y del ajo sobre la cantidad de proteína de la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD detectada inmunológicamente en la médula renal. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras.

7. Contenido de gentamicina en la corteza renal

En la figura 12 se muestra que el tratamiento con ajo no tuvo efecto sobre el contenido renal de la GM, ya que el contenido de este antibiótico en el grupo tratado con ajo (GM+A: 3.73 ± 0.32) fue muy similar al encontrado en el grupo tratado con el antibiótico solo (GM: 4.5 ± 0.7).

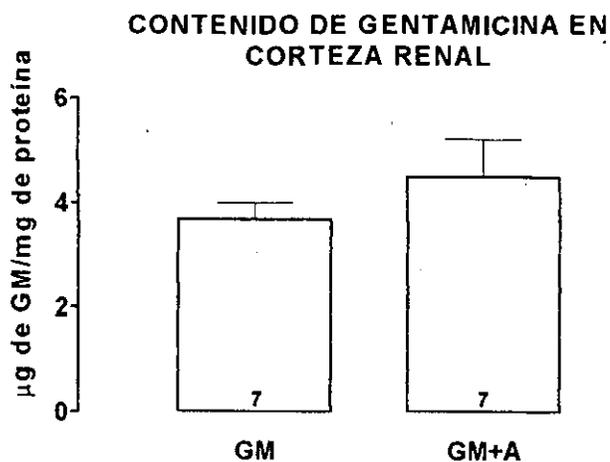


Figura 12. Efecto del ajo sobre la concentración de la GM en la corteza renal. El número de datos para cada grupo se indica dentro de las barras.

VIII. DISCUSIÓN

La gentamicina (GM) se utiliza ampliamente en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gramnegativas (Ali, 1995). Sin embargo, su efecto nefrotóxico complica el manejo de los pacientes hospitalizados, lo que implica un problema clínico serio y representa una carga económica grande (Eisenberg *et al.*, 1987). A pesar de esto, los aminoglicósidos siguen siendo muy utilizados quizá por su bajo costo y su amplio espectro bactericida. Por lo tanto, su valor terapéutico aumentaría si se logrará disminuir su nefrotoxicidad. El mecanismo por el cual se induce la insuficiencia renal no está claro; sin embargo, existen evidencias que apoyan la participación de las EROs (Walker & Shah, 1988). Debido a esto y dadas las propiedades antioxidantes del polvo de ajo (Rietz *et al.*, 1993; Granados-Silvestre *et al.*, 1999) así como, a su capacidad de modular los niveles de enzimas antioxidantes (Wei & Lau, 1998) exploramos su efecto sobre la nefrotoxicidad inducida por la GM y sobre los niveles de las enzimas antioxidantes Mn-SOD y Cu,Zn-SOD.

La participación de las EROs como un mecanismo de inducción de la nefrotoxicidad por la GM se midió como contenido de malondialdehído y 4-hidroxinonenal. En este trabajo, encontramos un aumento en la lipoperoxidación en la corteza renal de las ratas tratadas con GM, lo que concuerda con lo encontrado por otros autores (Ramasammy *et al.*, 1987; 1986; 1985; Nakajima *et al.*, 1994; Walker & Shah, 1988; Fauconneau *et al.*, 1995). El aumento en la lipoperoxidación está asociado con un aumento en la producción de las EROs. Se sabe que la GM, *in vitro* aumenta la generación de las EROs en la mitocondria renal (Walker & Shah, 1987; Yang *et al.*, 1995; Shah & Walker, 1992) y la lipoperoxidación *in vivo* en la corteza renal de las ratas tratadas con este antibiótico (Guidet & Shah, 1989).

El ajo evitó el incremento de la lipoperoxidación en la corteza renal de ratas tratadas con GM, lo cual se puede deber a que previene la disminución en la actividad de la Mn-SOD, a sus propiedades antioxidantes (Granados-Silvestre *et al.*, 1999; Augusti & Sheela, 1996; Török *et al.*, 1989; Ide *et al.*, 1996; Wei & Lau, 1998) o a que disminuye la producción de EROs en la mitocondria renal. Lo anterior confirma los hallazgos encontrados *in vitro*, ya que se ha demostrado que el ajo puede prevenir la lipoperoxidación (Horie *et al.*, 1989; Imai *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1996; Ide *et al.*, 1996).

A pesar de que en este trabajo no se midió la producción de las EROs, podemos especular que el aumento en la lipoperoxidación se debe a un desbalance oxidante-antioxidante, ya sea

por un aumento de las EROs o bien por una disminución en los mecanismos de defensa antioxidante. Sin embargo, es necesario realizar experimentos que muestren que la formación de EROs precede a la disminución en la actividad de la Mn-SOD y de la lipoperoxidación.

El papel de las enzimas antioxidantes, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD, se evaluó en este modelo de insuficiencia renal inducida por GM. En la corteza renal se observó una disminución en la actividad de la Mn-SOD sin cambio en la cantidad de proteína, mientras que la actividad y la cantidad de proteína de la Cu,Zn-SOD no cambiaron en las ratas tratadas con GM. Por otro lado, se encontró que la actividad y la cantidad de proteína de la Mn-SOD y de la Cu,Zn-SOD en la médula renal no cambió en ninguno de los grupos. Lo anterior es consistente con el hecho de que la GM se acumula en las células del túbulo proximal, que se encuentran en la corteza renal. La disminución de la Mn-SOD en la corteza renal se puede deber a la presencia de las EROs, como lo indica el incremento en la lipoperoxidación. Las EROs pueden causar inactivación de las proteínas a nivel de los aminoácidos susceptibles (Tyr, Phe, Trp, His, Met y Cis) (Stadtman, 1990). Además, la Mn-SOD puede ser inactivada por el peroxinitrito, un radical libre que se forma de la reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico (MacMillan-Crow & Thompson, 1999). El peroxinitrito es un oxidante potente que, cuando se protona, se puede disociar para formar el radical hidroxilo y el dióxido de nitrógeno, ambos oxidantes potentes (Oury *et al.*, 1996). Por otro lado, la disminución en la actividad de la Mn-SOD y no en la actividad de la Cu,Zn-SOD se puede deber a un incremento en la producción de EROs en la mitocondria, ya que la GM induce alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias de la corteza renal, antes de que ocurra la muerte celular (Simmons *et al.*, 1980). Dichas alteraciones comprenden la respiración mitocondrial (Weinberg & Humes, 1980) que podría incrementar la producción del anión superóxido y si existe SOD en el medio la del peróxido de hidrógeno (Saalin, 1991). Estos hallazgos indican que la GM podría incrementar la producción de EROs en las mitocondrias de la corteza renal, similar a lo que ocurre *in vitro* donde la GM incrementa la producción de éstas, las cuales podrían ser las responsables de la inactivación de la Mn-SOD. (Walker & Shah, 1987; Yang *et al.*, 1995; Shah & Walker, 1992).

El efecto protector del polvo de ajo puede asociarse a sus propiedades antioxidantes (Granados-Silvestre *et al.*, 1999) lo cual puede proteger a la Mn-SOD de la inactivación por las EROs.

La nefrotoxicidad inducida por la GM causa alteraciones tubulares como un incremento en la excreción urinaria de la NAG y de proteínas, así mismo produce necrosis del túbulo proximal

(Patel *et al.*, 1975; Wellwood *et al.*, 1976b) y alteraciones en la función glomerular (Baylis *et al.*, 1977).

Alteración de la función del túbulo proximal

La administración de GM por 6 días incrementó significativamente la excreción urinaria de la NAG y de las proteínas totales a partir del día 3, observándose el mayor incremento en el día 7. El tratamiento con ajo disminuyó significativamente el incremento en la excreción urinaria de la NAG y de las proteínas, así como de la lipoperoxidación, sin modificar el contenido renal de GM. El efecto protector del ajo sugiere que las EROs pueden estar involucradas en las alteraciones tubulares inducidas por este antibiótico, ya que el ajo puede atrapar EROs (Török *et al.*, 1994; Ide *et al.*, 1996) y disminuir la producción renal *in vivo* de H₂O₂ (Granados-Silvestre *et al.*, 1999). Además puede estar asociado con el hecho de que el ajo evitó la disminución de la actividad de la Mn-SOD en la corteza renal, lo cual es consistente con otros estudios en donde se ha observado que la administración exógena de la SOD (8000 U/Kg) disminuye la nefrotoxicidad inducida por la GM (Ali & Bashir, 1996) lo que sugiere una participación del anión superóxido. Por el contrario Nakajima *et al.* (1994) encontraron que la administración exógena de la SOD no disminuye ni la excreción urinaria de la NAG ni el daño tubular, pero sí el daño glomerular. Por otro lado, el incremento en la excreción urinaria de la NAG y de las proteínas, puede estar asociado con la necrosis de las células del túbulo proximal (Laurent & Tulkens, 1987) por la acumulación de fosfolípidos lo que interfiere con la función normal de los lisosomas (Silverblatt & Kuehn, 1979). También se ha visto que la GM interfiere con los procesos de fusión vacuola-lisosomas, con la degradación enzimática de las proteínas reabsorbidas por las células tubulares (Cojocel *et al.*, 1983) y con el reciclaje de membranas (Lauren *et al.*, 1990), procesos que, según Laurent & Tulkens (1987), podrían ser el primer paso en una serie de eventos que lleven a la necrosis tubular. De esta manera, la muerte celular, causada por la acumulación de los fosfolípidos, la alteración de los procesos de fusión vacuola-lisosomas y el reciclaje de las membranas podrían también ser factores involucrados en la alteración de la excreción urinaria de la NAG y de las proteínas. Sin embargo, no se sabe cual es la conexión entre la fosfolipidosis y la producción de EROs. El efecto protector del ajo puede asociarse con la atenuación del daño tubular inducido por la GM, como lo demuestran los datos histológicos obtenidos, en los que se observa que las ratas tratadas con GM y alimentadas con ajo muestran un menor daño histológico.

Alteración de la función del glomérulo

El tratamiento con ajo previno el incremento en los niveles de la creatinina y del BUN en el plasma sanguíneo de las ratas tratadas con GM, así como la disminución en la depuración de la creatinina, parámetros que han sido empleados como marcadores de la disfunción renal glomerular (Schor *et al.*, 1981). El incremento en los niveles de la creatinina y del BUN en plasma sanguíneo, así como la disminución en la depuración de creatinina puede asociarse con la producción de EROs, ya que estas pueden inducir disminución en la velocidad de filtración glomerular (GFR). Duque *et al.* (1992), encontraron que las EROs y en particular el H_2O_2 induce contracción de las células mesangiales (células presentes en el glomérulo y que se encargan de la contracción del mismo), lo cual modifica la superficie de filtración y consecuentemente el coeficiente de ultrafiltración capilar glomerular (K_f) y por tanto la GFR. El factor activador de plaquetas (PAF), un vasoconstrictor, podría ser un mediador secundario de la respuesta celular al H_2O_2 , ya que el H_2O_2 estimula la síntesis de PAF en cultivos de células mesangiales (Duque *et al.*, 1992). Además, se ha demostrado que las EROs liberadas por los polimorfonucleares disminuyen el K_f y la GFR e incrementan la resistencia arteriolar, lo cual se previene por la administración exógena de catalasa, lo que sugiere un papel del H_2O_2 en la modulación de estos parámetros (Yoshioka *et al.*, 1989). Por otro lado, al disminuir la actividad de la Mn-SOD en la corteza renal de las ratas tratadas con GM se aumenta la concentración de anión superóxido, que puede reaccionar rápidamente con el óxido nítrico (NO, un vasodilatador) inactivándolo, lo que conduciría a una disminución de la GFR (Rivas-Cabañero *et al.*, 1997). La GM estimula la síntesis del NO y las ratas que reciben GM + N^G -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), un análogo de la L-arginina que inhibe la producción de NO, presentan mayor deterioro de la función renal que el observado en las ratas tratadas únicamente con GM. Lo anterior sugiere que la síntesis de óxido nítrico se incrementa para proteger al riñón del daño inducido por la GM (Rivas-Cabañero *et al.*, 1995).

Otros factores que pueden estar involucrados en la disminución de la GFR son: 1) la GM *per se* induce una disminución del área superficial en las células mesangiales en cultivo efecto considerado por muchos autores como una contracción de estas células (Rivas-Cabañero *et al.*, 1997). Dicho efecto puede deberse a que la GM estimula la producción del PAF, que es un vasoconstrictor que causaría una disminución del K_f y de la GFR (Rodríguez-Barbero *et al.*, 1995); sin embargo, el mecanismo por el cual la GM induce la síntesis de PAF aún no se conoce y 2) la GM inhibe la proteína de membrana fosfolipasa A_2 , una enzima que es la responsable de la producción del ácido araquidónico, precursor de la prostaglandina E_2 , que

es un vasodilatador. Se cree que la disminución de esta prostaglandina pudiera ser una causa de la disminución de GFR (Laurent & Tulkens, 1987). Estos hallazgos indican que la GM, a pesar de que no se acumula en el glomérulo, ejerce efectos sobre las células mesangiales sin producir cambios morfológicos en ellas, posiblemente a través de un mecanismo que involucra la participación de EROs.

El efecto protector del ajo sobre estos parámetros puede deberse a sus propiedades antioxidantes. Además, el ajo podría proteger a través de mecanismos alternos, ya que se ha descrito que el ajo (Rietz *et al.*, 1993) y algunos dipéptidos aislados y caracterizados en el extracto acuoso del mismo (Suetsuna, 1998) inhiben a la ECA, la cual es importante en la regulación de la presión arterial, ya que origina el octapéptido angiotensina II, el cual es un potente vasoconstrictor que induce disminución del GFR. Por otro lado, hay evidencias de que el ajo estimula la sintasa de óxido nítrico (SON) *in vitro* e *in vivo*. Los extractos etanólicos de ajo activan a la SON, enzima encargada de producir el NO (Das *et al.*, 1995a; 1995b; Das *et al.*, 1996). También existen evidencias de la activación de la SON *in vivo*, ya que la excreción urinaria de los nitratos y los nitritos, un índice de la actividad de SON, aumenta en la ratas tratadas con una dieta al 2 % de ajo (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1998). La prevención en la disminución de la actividad de la Mn-SOD es importante ya que aumentaría la vida media del NO, lo que se reflejaría en la prevención de la disminución de la GFR. Estas razones pudieran explicar, en parte, el posible efecto del ajo sobre la GFR y con ello explicar el efecto de esta sobre la concentración del BUN y la creatinina en el plasma sanguíneo, así como sobre la depuración de la creatinina.

No se observó efecto de la GM sobre el peso corporal. En cambio, el volumen urinario aumentó significativamente en el día 7 de tratamiento con GM, mientras que el ajo no evitó este incremento. El incremento observado con la GM, se puede deber a que ésta causa necrosis de las células del túbulo proximal, que se encargan de la reabsorción de iones como el sodio, el cual, por gradiente osmótico, arrastra agua y concentra la orina. Además, se ha visto que la GM disminuye en un 45% la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ (enzima presente en las células tubulares proximales) en homogeneizados renales de las ratas tratadas con el antibiótico (Williams *et al.*, 1984), lo que repercute en la reabsorción de estos iones y conduce a un incremento del volumen urinario.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el suplemento del polvo de ajo a la dieta disminuye la nefrotoxicidad inducida por la GM, previniendo el incremento en la lipoperoxidación y evitando la inactivación de la Mn-SOD, la cual puede ser secundaria a la producción de las EROs. El efecto protector del ajo puede deberse a sus propiedades antioxidantes.

Sería importante identificar los compuestos antioxidantes del polvo de ajo, para su futura aplicación con fines terapéuticos. Así mismo, sería conveniente estudiar las propiedades terapéuticas del ajo completo en pacientes tratados con GM.

X. BIBLIOGRAFÍA

Ali BH. 1995. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* 26:1477-1487

Ali BH, Bashir AK. 1996. Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol* 27:349-353

Ademuyiwa O, Ngaga EO, Ubah FO. 1990. Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Human Exp Toxicol* 9:281-288.

Appel GB. 1990. Aminoglycosides nephrotoxicity. *Am J Med* 88(Suppl 3c):165-205

Augusti KT, Sheela CG. 1996. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* 52:115-119

Bannister JV, Rotilio G. 1987. Aspects of the structure, function, and application of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22:111-180

Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Gen Med* 91:2S-13S

Baud L, Raymond A. 1986. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 251:F765-F776

Baylis C, Renke HR, Brenner BN. 1977. Mechanism of the defect in glomerular ultrafiltration associated with gentamicin administration. *Kidney Int* 12:344-353

Ben-Ismael TH, Ali BH, Bashir AA. 1994. Influence of iron, deferoxamine and ascorbic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol* 25:1249-1252

Bennett WM. 1983. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Nephron* 35:73-77

Bennett WM. 1989. Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16:1-6

Block E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 252:114-119

Block E, Cai XJ, Uden PC, Zhang X, Quimby BD, Sullivan JJ. 1996. *Allium* chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl Chem* 68:937-944

Calderon E. 1996. Pasado, presente y futuro de la gentamicina. Scheramex. México.

Cohen MS, Bradley E, Britigan D, Hassett J, Rosen GM. 1988. Phagocytes, O₂ reduction, and hydroxyl radical. *Rev Infect Dis* 10:1088-1096

Cojocel C, Dociu N, Maita K, Sleight SD, Hook JB. 1983. Effects of aminoglycosides on glomerular permeability, tubular reabsorption, and intracellular catabolism of the cationic low-molecular protein lysozyme. *Toxicol App Pharmacol* 68:96-109

Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. 1992. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10405-10409

Das I, Khan NS, Sooranna SR. 1995a. Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. *Biochem Soc Trans* 23:136S-138S

Das I, Khan NS, Sooranna SR. 1995b. Potent activation of nitric oxide synthase by garlic: a basis for its therapeutic applications. *Curr Med Res Opin* 13:257-263

Das I, Hirani J, Sooranna SR. 1996. Arginine is not responsible for the activation of nitric oxide synthase by garlic. *J Ethnopharmacol* 53:5-9

Duque I, García-Escribano C, Rodríguez-Puyol M, Díez-Marquéz ML, López-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodríguez-Puyol D. 1992. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 263:F466-F473

Eisenberg JM, Koffel H, Glick HA, Connell ML, Loss LE, Talbot GH, Shusterman NH, Strom BL. 1987. What is the cost of nephrotoxicity associated with aminoglycosides? *Ann Intern Med* 107:900-909

Fauconneau B, Tallineau C, Huguet F, Piriou A. 1995. Gentamicin-induced kidney damage and lipid peroxidation in rats. *Toxicol Lett* 76:127-134

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames B. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4533-4537

Fredericks WM, Bosch KS. 1997. Localization of superoxide dismutase activity in rat tissues. *Free Radic Biol Med* 22:241-248

Geng Z, Lau BHS. 1997. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 11:54-56

Granados-Silvestre M.A, Maldonado PD, Olivares IM, Medina-Campos ON, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 1999. Post-transcriptional control of renal catalase expression in garlic-treated rats. *J Am Soc Nephrol* 10:632A1999

Guidet BR, Shah SV. 1989. *In vivo* generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* 256:F158-F164

Gutteridge JMC, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 15:129-135

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. 1991. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:278-286

Horie T, Murayama T, Mishima T, Itoh F, Minamide Y, Fuwa T, Awazu S. 1989. Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med* 55:506-508

Hsu JL, Visner GA, Burr IA, Nick HS. 1992. Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: isolation, characterization and species comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 186:936-943

Huberman A. 1985. Biología de los radicales de oxígeno, En: Bioquímica. Días ZJC, Hicks GJJ (eds). Interamericana-Mc Graw-Hill, México D.F.

Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 10:340-341

Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 60:417-420

Iqbal J, Whitney P. 1991. Use of cyanide and diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med* 10:69-77

Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. 1993. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 69:261-274

Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, Adler S, Klebanoff SJ. 1987. New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *J Clin Invest* 79:1379-1387

Jung K, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. 1991. Methods compared for determining activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme* 45:215-221

Kacew S. 1989. Inhibition of gentamicin-induced nephrotoxicity by piridoxal-5-phosphate in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 248:360-366

Kacew S, Bergeron MG. 1990. Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 51:241-259

Kaloyanides GJ. 1984. Aminoglycoside-induced functional and biochemical defects in the renal cortex. *Fundam Appl Toxicol* 4:930-943

Kays SE, Crowell WA, Johnson MA. 1992. Iron supplementation increases gentamicin nephrotoxicity in rats. *J Nutr* 121:1869-1875

Krinsky NI. 1988. Membrane antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 551:17-33

Krinsky NI. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *PSEBM* 200:248-254

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Laurent G, Tulkens PM. 1987. Aminoglycoside nephrotoxicity: cellular and molecular aspects. *Pharmacol* 1:40-44

Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. 1990. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 40:2383-2392

Lewin G, Popov I. 1994. Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 2nd communication: inhibition of the Cu^{2+} -initiated oxidation of low density lipoproteins. *Drug Res* 44:604-607

Lowry OA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:267-275

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. 1996. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11853-11858

MacMillan-Crow LA, Thompson JA. 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 366:82-88

Marklund SL. 1982a. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7634-7638

Marklund SL, Holme E, Hellner L. 1982b. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chem Acta* 126:41-51

Marklund S, Karlsson K. 1990. Extracellular-superoxide dismutase, distribution in the body and therapeutic applications. *Adv Exp Med Biol* 264:1-4.

Mathew TH. 1992. Drug-induced renal disease. *Med J Australia* 156:724-728

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Nakajima T, Hishida A, Kato A. 1994. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* **266**:F425-F431

Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* **105**:457-464

Oury TD, Day BJ, Crapo JD. 1996. Extracellular superoxide dismutase: A regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* **75**:617-636

Ozturk HS, Kavutcu N, Kacmaz N, Cambolat O, Durak I. 1997. Effect of gentamicin on the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzymes and malondialdehyde levels in heart tissues of guinea pigs. *Curr Med Res Opin* **14**:47-52

Pan J, Hong JY, Li D, Schuetz EG, Guzelian PS, Huang W, Yang CS. 1993a. Regulation of cytochrome P450 1B1/2 genes by diallyl sulfone, disulfiram, and other organosulfur compounds in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **45**:2323-2329

Pan J, Hong JY, Ma BL, Ning SM, Paranawithana SR, Yang CS. 1993b. Transcriptional activation of cytochrome P450 2B1/2 genes in rat liver by diallyl sulfide a compound derived from garlic. *Appl Biochem Biotec* **302**:337-342

Patel V, Luft FC, Yum MN, Patel B, Zeman W, Kleit SA. 1975. Enzymuria in gentamicin-induced kidney damage. *Antimicrob Agents Chemother* **7**:364-369

Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Bobadilla N. 1992. Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the spin-trapping agent α -phenyl-*N*-tert-butyl nitron (PBN). *Ren Fail* **14**:467-471.

Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Larriva-Sahd J, Juarez RM, Orozco H, Hernández-Pando R, Tapia E. 1995a. Angiotensin I converting enzyme in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* **17**:365-375

Pedraza-Chaverri J, Arévalo AE, Hernández-Pando R, Larriva-Sahd J. 1995b. Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. *Int J Biochem Cell Biol* **27**:683-691

Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Medina-Campos ON, Granados MA, Franco M. 1998. Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* **62**:PL71-PL77.

Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 1999. Effect of the *in vivo* catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med* **27**:245-253

Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. 1995. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* **148**:183-189

- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. 1996. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* **154**:55-63
- Priuska EM, Schacht J. 1995. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* **50**:1749-1752
- Ramsammy L, Ling KY, Josepovitz C, Levine R, Kaloyanides GJ. 1985. Effect of gentamicin on lipid peroxidation in rat renal cortex. *Biochem Pharmacol* **34**:3895-3900
- Ramsammy L, Josepovitz C, Ling KY, Lane BP, Kaloyanides GJ. 1986. Effects of diphenyl-phenylenediamine on gentamicin-induced lipid peroxidation and toxicity in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* **238**:83-88
- Ramsammy L, Josepovitz C, Ling KY, Lane BP, Kaloyanides GJ. 1987. Failure of lipid peroxidation by vitamin E to protect against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Biochem Pharmacol* **36**:2125-2132
- Ramsammy L, Josepovitz C, Lane BP, Kaloyanides GJ. 1989. Polyaspartic acid protects against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **250**:149-153
- Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R. 1993. Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* **119**:143-150
- Rivas-Cabañero L, López-Novoa JM, Arévalo M. 1995. Effect of N^g-nitro-L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Nephron* **1**:203-207
- Rivas-Cabañero L, Rodríguez-López AM, Martínez-Salgado C, Saura M, Lamas S, López-Novoa JM. 1997. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp Nephrol* **5**:23-30
- Rodríguez-Barbero A, Rodríguez-López AM, González-Sarmiento R, López-Novoa JM. 1995. Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet activating factor. *Kidney Int* **47**:1346-1353
- Salin ML, Day DE, Crapo JD. 1978. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from rat liver. *Arch Biochem Biophys* **187**:223-228
- Sandhya P, Varalakshmi P. 1997. Effect of lipoic acid administration on gentamicin-induced lipid peroxidation in rats. *J Appl Toxicol* **17**:405-408
- Sastrasinh M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD. 1982. Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* **222**:350-358

Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. 1981. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 19:288-296

Shah SV, Walker PD. 1992. Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure. *Ren Fail* 14:363-370

Silverblatt FJ, Kuehn C. 1979. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 15:335-345

Simmons CF, Ronald TB, Humes HD. 1980. Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 214:709-715

Sohal RS, Svensson I, Sohal BM, Brunk TU. 1989. Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing Dev* 49:129-135

Stadtman ER. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanisms and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9:315-321

Stratta P, Segoloni GP, Canavese C, Muzio G, Dogliani M, Serra A, Allemandi P, Salomone M, Caramellino C, Canuto R. 1994. Oxygen free radicals are not the main factor in experimental gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* 16:445-455

Suetsuna K. 1998. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *J Nutr Biochem* 9:415-419

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306:284-287

Thornalley PJ, Wolff SP, Crabbe MJ, Stern A. 1984. The oxidation of oxyhemoglobin by glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Biochem J* 217:615-622

Török B, Belágyi J, Rietz B, Jacob R. 1994. Effectiveness of garlic on the radical activity in radical generating systems. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 44:608-610

Tulkens PM. 1989. Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol Lett* 46:107-123

Tyler DD. 1975. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J* 147:493-504

Ueda N, Guidet B, Shah SV. 1993. Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 265:F435-F439

Walker PD, Shah SV. 1987. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 253:C495-C499

Walker PD, Shah SV. 1988. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* **81**:334-341

Walker PD, Barri Y, Shah SV. 1999. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* **21**:433-442

Wei Z, Lau BHS. 1998. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* **18**:61-70

Weinberg JM, Hunt D, Humes HD. 1985. Distribution of gentamicin among subcellular fractions from rat renal cortex. *Biochem Pharmacol* **34**:1779-1787

Weinberg JM, Humes HD. 1980. Mechanisms of gentamicin-induced dysfunction of renal cortical mitochondria: effects on mitochondrial respiration. *Arch Biochem Biophys* **205**:222-231

Weisiger RA, Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* **248**:4793-4796

Weiss S. 1986. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* **548**:9-37

Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. 1976a. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* **69**:85-91

Wellwood JM, Lovell D, Thompson AE, Tighe JR. 1976b. Renal damage caused by gentamicin: A study of the effects on renal morphology and urinary enzyme excretion. *J Pathol* **118**:171-182

Williams PD, Trimble ME, Crespo L, Holohan PD, Freedman JC, Ross CR. 1984. Inhibition of renal Na⁺-K⁺-ATPase by gentamicin. *J Pharmacol Exp Ther* **231**:248-253

Yang CL, Du XH, Han YX. 1995. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* **17**:21-26

Yoshioka T, Ichikawa I. 1989. Glomerular dysfunction induced by polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Am J Physiol* **257**:F53-F59

Zentella PM, Corona GD, Saldaña BY. 1994. Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *BEB* **13**:87-93