

00361

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

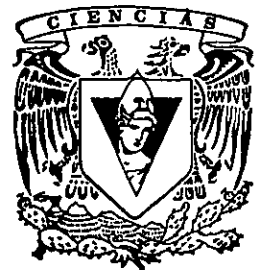
**FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

**"EFECTO DEL AJO SOBRE LA NEFROTOXICIDAD POR
GENTAMICINA: PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS
DE OXIGENO Y LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLÓGICAS)
P R E S E N T A :
IVONNE MARIA OLIVARES CORICHI

MEXICO, D. F.

2000





Universidad Nacional
Autónoma de México

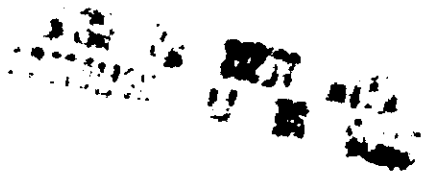


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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 de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Beca No. 130062), y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (proyecto IN203797)

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de una manera muy especial a mis amigos del laboratorio 209, su ayuda incondicional y su valiosa amistad.

M. en C. María de los Angeles Granados Silvestre.

M. en C. Omar Noel Medina Campos.

M. en C. Perla D. Maldonado Jiménez.

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta.

Dra. María Guadalupe Ortiz López.

Dra. María Elena Ibarra Rubio.

Dr. José Pedraza Chaverri.

Biólogo Cristino Cruz.

Médico Pablo Bautista.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, principalmente a:
mi madre Sra. Yolanda Corichi Vázquez
mi padre Sr. Lucio Olivares Baez
porque han estado a mi lado siempre.

También quiero dedicarlo a alguien muy especial para mí, alguien
que me ha hecho muy feliz durante ya algunos años.
A ti mi amor, mi incondicional compañero.
Francisco Cruz Vázquez.

ÍNDICE

	Página
i. RESUMEN	
ii. ABREVIATURAS	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PRODUCCION BIOLÓGICA DE LAS ERO	1
1.1.A. Anión superóxido.	1
1.1.B. Radical hidroxilo	2
1.1.C. Singulete de oxígeno	3
1.2. DEFENSAS BIOLÓGICAS CONTRA LAS ERO	3
1.2.A. Superóxido dismutasa (SOD)	3
1.2.B. Catalasa (CAT)	4
1.2.C. Glutati3n peroxidasa (GSH-Px).	5
1.2.C.1. cGSH-Px.	5
1.2.C.2. pIGSH-Px.	5
1.2.C.3. gIGSH-Px.	6
1.2.C.4. PHGSH-Px.	6
1.3. OTRAS DEFENSAS CONTRA EL DAÑO OXIDATIVO	6
1.4. EFECTOS E IMPLICACIONES MÉDICAS DE LAS ERO	7
1.5. GENERALIDADES DEL RIÑÓN	7
1.6. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA NEFROTÓXICA	9
1.6.A. Insuficiencia renal aguda.	9
1.6.B. Insuficiencia renal aguda nefrotóxica.	9
1.6.C. Distribuci3n de las ERO y de las enzimas antioxidantes en el riñ3n.	10
1.7. GENTAMICINA (GM)	10
1.7.A. Estructura quí mica de la GM.	11
1.7.B. Mecanismo de acci3n de la GM.	11
1.7.C. Farmacocinética y biodisponibilidad de la GM.	12
1.7.D. Toxicidad de la GM.	12
1.7.D.1. Nefrotoxicidad.	12
1.7.D.2. Alteraciones glomerulares producidas por GM.	12
1.7.D.3. Alteraciones tubulares producidas por GM.	13
1.7.D.4. Otras alteraciones producidas por GM.	14

1.8 EVIDENCIAS DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS ERO EN LA NEFROTOXICIDAD POR GENTAMICINA	14
1.9 ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL MODELO DE NEFROTOXICIDAD POR GM	15
1.10. CARACTERÍSTICAS DEL AJO (<i>Allium sativum</i>)	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS GENERALES	18
IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES	18
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	19
V.1. DIETAS	19
V.2. DETERMINACIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA EN SUERO, ORINA Y RIÑÓN	19
V.3. LIPOPEROXIDACIÓN POR EL MÉTODO DE OHKAWA	20
V.4. LIPOPEROXIDACIÓN CON UN ESTUCHE COMERCIAL	20
V.5. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS	21
V.5.A. Actividad de la glutatión peroxidasa citosólica en médula y corteza.	21
V.5.B. Actividad de la glutatión peroxidasa plasmática.	21
V.5.C. Actividad de la catalasa en médula y corteza.	21
V.5.D. Actividad de N-acetil- β -D-glucosaminidasa en orina.	22
V.6. SÍNTESIS DE LA SONDA DE CATALASA (CAT)	22
V.7. DETERMINACIÓN DEL ARNm DE CAT	23
V.7.A. Extracción y electroforesis del ARNm total.	23
V.7.B. Northern blot.	23
V.7.C. Determinación de las unidades relativas densitométricas.	23
V.8. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA DE CAT	24
V.8.A. Extracción de proteínas totales.	24
V.8.B. Western blot.	24
V.9. ESTUDIOS DE HISTOLOGÍA EN CORTEZA RENAL	25
V.10. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GM EN CORTEZA RENAL	25
V.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
VI. RESULTADOS	26
VI.1. MODELO 1	27
VI.2. MODELO 2	27
VI.3. MODELO 3	28

VI.3.A. Función renal para el modelo 3.	29
VI.3.B. Marcadores de estrés oxidativo para el modelo 3.	30
VI.3.C. Actividades de las enzimas antioxidantes para el modelo 3.	30
VI.4. MODELO 4	31
VI.4.A. Función renal para el modelo 4	32
VI.4.B. Marcador de estrés oxidativo para el modelo 4	35
VI.4.C. Actividad de las enzimas antioxidantes GSH-Px para el modelo 4.	35
VI.4.D. Expresión de la enzima CAT para el modelo 4.	36
VI.4.E. Contenido de gentamicina en corteza renal para el modelo 4.	39
VI.4.F. Daño histológico para el modelo 4.	39
VII. RESUMEN DE RESULTADOS	41
VIII. DISCUSIÓN	42
VII.1. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	42
VIII.2. DISFUNCIÓN TUBULAR	42
VIII.3. DISFUNCIÓN GLOMERULAR	43
VIII.4. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE cGSH-Px	44
VIII.5. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE CAT	44
IX. CONCLUSIONES	46
X. APÉNDICES	47
APÉNDICE 1	47
APÉNDICE 2	47
APÉNDICE 3	48
APÉNDICE 4	49
XI. REFERENCIAS	50

i. RESUMEN

Antecedentes

La gentamicina (GM) es un antibiótico extremadamente eficaz y es ampliamente utilizado, principalmente contra bacterias gram-negativas, en particular contra los gérmenes de fuente entérica (enterobacterias). Sin embargo, uno de los efectos secundarios del uso de este medicamento es la nefrotoxicidad. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los pacientes tratados con GM, después de 7 días muestran señales de insuficiencia renal aguda, lo cual limita el uso de este antibiótico.

Planteamiento del problema

La GM es utilizada en gran medida, debido a la larga experiencia en su uso, a su bajo costo, a que desarrolla poca resistencia, a su rápida efectividad, así como el hecho de que se conoce muy bien su farmacología, toxicidad y propiedades terapéuticas, por lo que, si se encontrara la forma de eliminar o disminuir la nefrotoxicidad, la utilidad clínica de este antibiótico aumentaría.

A pesar de que no se conoce el mecanismo exacto por el cual la GM induce nefrotoxicidad, se ha postulado que las especies reactivas de oxígeno (ERO) están implicadas en el daño renal que produce.

Por otro lado, se ha demostrado que el ajo posee propiedades antioxidantes, por lo que podría modular la expresión de algunas enzimas antioxidantes, además de que tiene un costo bajo y su uso está muy extendido.

Por lo tanto, resulta muy atractivo estudiar el efecto protector del ajo en este modelo de nefrotoxicidad, ya que la información que este trabajo genere puede ser útil para intentar desarrollar estrategias que reduzcan o prevengan la nefrotoxicidad inducida por la GM.

Objetivos

En este trabajo se planteó determinar si la GM produce alteraciones en la expresión renal de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa citosólica y glutatión peroxidasa plasmática e investigar si la alimentación con ajo tiene efecto protector sobre la nefrotoxicidad por GM y si esta alimentación altera la expresión de las enzimas antioxidantes antes mencionadas.

Métodos

El trabajo se realizó en ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 150-200 g de peso, que se dividieron en 4 grupos de 8 ratas cada uno: control (CT), gentamicina (GM), control alimento con ajo (A) y gentamicina alimentado con ajo (GM+A). La GM se administró cada 12 horas durante 6 días subcutáneamente en una dosis de 75 mg/Kg. Los animales se colocaron en jaulas metabólicas y se recolectó la orina de 24 horas cada tercer día para medir la excreción de proteínas totales y la actividad de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa. Además, en la orina y en el plasma que se recolectaron el día del sacrificio (día 7), se midió la concentración de creatinina y de sodio para calcular el índice de la reabsorción tubular de agua, la depuración de creatinina y la fracción excretada de sodio. En el plasma, también se determinó nitrógeno de

urea (BUN) y la actividad de pGSH-Px. Los riñones se dividieron en médula y corteza para determinar en ambas porciones la actividad, la cantidad de proteína y los niveles de ARNm de CAT y la actividad de cGSH-Px. Paralelamente, se midió la lipoperoxidación en la corteza renal, un marcador de estrés oxidativo. Además en la corteza renal se realizaron estudios histológicos y se determinó la concentración de GM.

Resultados

La GM provocó alteraciones a nivel tubular (aumento de la excreción urinaria de proteínas y de NAG, daño histológico y disminución en la actividad de la pGSH-Px en plasma) y glomerular (aumento de creatinina y nitrógeno de urea en plasma, y disminución en la depuración de creatinina). La GM también aumentó la lipoperoxidación en la corteza renal. El ajo disminuyó el daño tubular, glomerular y la lipoperoxidación causado por la GM, sin que disminuyera la concentración del antibiótico en la corteza renal. También la actividad de la enzima cGSH-Px en corteza renal disminuyó en el grupo GM y el ajo previno esta disminución. La actividad de pGSH-Px disminuyó en el grupo tratado con GM y el ajo previno parcialmente esta disminución. La GM disminuyó la actividad, la cantidad y los niveles de ARNm de CAT en la corteza renal. Los grupos A y GM+A tuvieron el mismo comportamiento, la actividad y la cantidad de CAT disminuyeron en corteza renal, pero los niveles de ARNm no cambiaron. En cuanto a las mediciones realizadas en médula, se observó que los grupos GM, A y GM+A tuvieron el mismo comportamiento, la actividad y la cantidad de CAT disminuyó, pero no los niveles de ARNm.

Conclusiones

La GM alteró la expresión de las enzimas antioxidantes estudiadas tanto en la corteza como en la médula renal. La alimentación con ajo tuvo efecto protector, el cual se asoció con la prevención del incremento en la lipoperoxidación y de la disminución de la actividad de cGSH-Px en la corteza renal.

II ABREVIATURAS

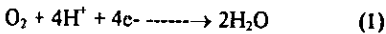
A	Grupo alimentado con ajo al 2%
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATZ	3 amino-1,2,4 triazol
BUN	Nitrógeno de urea en plasma
CAT	Catalasa
CT	Grupo control
cGSH-Px	Glutación peroxidasa citosólica
CuZnSOD	Superóxido dismutasa que contiene cobre y zinc
DAS	Dialil sulfuro
DE	Desviación estandar
DEPC	Diethylpicrocarbonato
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disódico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GFR	Índice de filtración glomerular
gIGSH-Px	Glutación peroxidasa gastrointestinal
GM	Gentamicina y/o grupo tratado con gentamicina
GM+A	Grupo tratado con gentamicina y alimentado con ajo
GSH	Glutamil cisteinil glicina (glutación reducido)
GSH-Px	Glutación peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
4-HNE	4-hidroxi-2-(E)-nonenal
HRP	Peroxidasa de rábano
IRA	Insuficiencia renal aguda
Kf	Cociente de ultrafiltración capilar glomerular
MDA	Malondialdehído
MnSOD	Superóxido dismutasa que contiene manganeso
MOPS	Ácido propanesulfónico 3-N-Morfolino
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
O ₂ ⁻	Anión superóxido
¹ O ₂ [*]	Singlete de oxígeno
OH	Radical hidroxilo
PAF	Factor activador de plaquetas
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PHGSH-Px	Glutación peroxidasa de fosfolípidos
plGSH-Px	Glutación peroxidasa plasmática
Q _A	Flujo plasmático glomerular inicial
r. p. m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Lauril sulfato de sodio
Se	Selenio
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
UV	Luz ultra violeta

“ EFECTO DEL AJO SOBRE LA NEFROTOXICIDAD POR GENTAMICINA: PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES ”

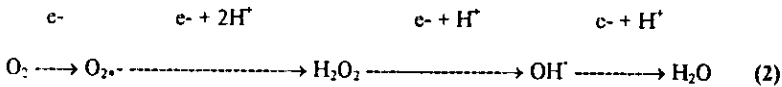
I. INTRODUCCIÓN

A pesar de que el oxígeno es indispensable para la vida aeróbica, es tóxico a altas concentraciones. Algunas evidencias de toxicidad del oxígeno son las siguientes: la respiración de O_2 al 100% es letal para la rata en menos de 72 horas, los seres humanos recién nacidos sometidos a oxigenoterapia prolongada sufren lesiones retinianas y pulmonares; y en los síndromes de isquemia/reperfusión (infarto de miocardio, choque circulatorio y trasplante de órganos) el daño tisular se extiende y agrava precisamente durante la reperfusión (1-3). Estos datos han llevado a la conclusión de que la toxicidad del oxígeno y de sus derivados juega un papel primordial en algunas lesiones tisulares y celulares.

La mayor parte del oxígeno utilizado por los organismos aerobios es reducido a agua por la acción del complejo citocromo oxidasa (citocromo aa3) de la cadena respiratoria mitocondrial, según la siguiente reacción global:



Esta reducción también puede llevarse a cabo en cuatro pasos univalentes:



(anión superóxido) (peróxido de hidrógeno) (radical hidroxilo)

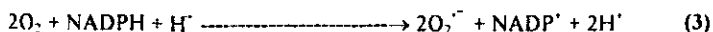
Estos intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo oxidasa y no se difunden al resto de la célula. Estos derivados del oxígeno o especies reactivas de oxígeno (ERO) se forman por la reducción incompleta del oxígeno molecular. Una de las exigencias de la aerobiosis es contar con una batería de moléculas y enzimas que atrapen o metabolicen las especies reactivas de oxígeno: anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y singulete de oxígeno ($^1O_2^*$) (4).

I.1. PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE LAS ERO

I.1.A. Anión superóxido. Cuando una molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, o sea el anión superóxido.

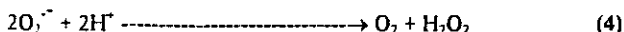
Una pequeña proporción de O_2 utilizado en la respiración mitocondrial, escapa como superóxido (1 a 2% del O_2 consumido). Quizá la fuente más importante de radicales superóxido *in vivo* es la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas. En la membrana citoplásmica de estas células se encuentra un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que cataliza la siguiente reacción:

NADPH oxidasa



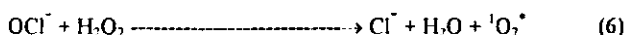
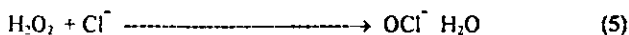
La enzima superóxido dismutasa en el citoplasma del fagocito, cataliza la siguiente reacción

Superóxido dismutasa



Los fagocitos contienen también una mieloperoxidasa, que utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para transformar los halogenuros, según las siguientes reacciones.

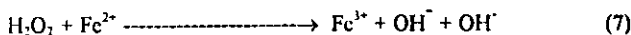
Mieloperoxidasa



Como puede verse en las reacciones 3 y 6, el aumento del consumo de oxígeno en la descarga respiratoria de los fagocitos está destinado a producir una gran cantidad de metabolitos del oxígeno, como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el singulete de oxígeno, que tienen poder bactericida, aun cuando no todos sean propiamente radicales (4).

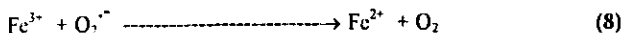
1.1.B. Radical hidroxilo. Se forma al estar presentes el radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno en un medio biológico que contiene hierro. Es un oxidante en extremo reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos.

El peróxido de hidrógeno formado en la reacción 4, a pesar de no ser en sí un radical, tiene una importancia vital, ya que en presencia de los metales de transición Cu^+ o Fe^{2+} da lugar a la reacción de Fenton.

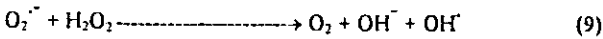


con la producción del radical hidroxilo (OH^{\cdot}).

Por otro lado, el anión superóxido aumenta la producción de Fe^{2+} , y por lo tanto, la reacción de Fenton, por medio de la siguiente reacción.



El conjunto de las reacciones descritas, o sea la dismutación del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual a su vez, se descompone en el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) con intervención del Fe^{2+} y la regeneración de este último por medio del anión superóxido, constituye el ciclo de Haber-Weiss (reacción 9)



La coexistencia del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, en un medio biológico que inevitablemente contiene hierro, es muy peligrosa, ya que el radical hidroxilo (OH^\cdot) formado, es un oxidante en extremo reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos, a velocidades sólo limitadas por su difusión (4).

1.1.C. Singlete de oxígeno. Como el singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$) no tiene electrones desapareados, no constituye realmente un radical libre de O_2 , pero por su gran reactividad e intervención en muchas reacciones en las que participa el oxígeno molecular, se incluye aquí. Se forma, sobre todo, cuando algunos pigmentos biológicos se iluminan en presencia de oxígeno, por ejemplo, clorofila, retinal, flavinas y porfirinas. Tiene una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo lípidos de las membranas. Además, tiende a formarse en grandes cantidades en tejidos y órganos sometidos a radiaciones ionizantes terapéuticas (4).

1.2. DEFENSAS BIOLÓGICAS CONTRA LAS ERO

Cuando los sistemas productores de especies reactivas de oxígeno sobrepasan la capacidad neutralizante de los sistemas de defensa, sobreviene la enfermedad local o generalizada.

Estas defensas consisten primeramente en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios. Esto lo logra con una gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa, el cual reduce más del 90% del oxígeno en el organismo humano.

En segundo lugar están algunas enzimas especializadas: superóxido dismutasas (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasas (GSH-Px) (Figura 1).

1.2.A. Superóxido dismutasa (SOD).

Las isomorfias de SOD son metaloenzimas que catalizan la dismutación del ion superóxido para producir oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno según la reacción 4.

Se han identificado tres isomorfias de SOD: la que contiene Cu y Zn (CuZnSOD) que se localiza principalmente en citoplasma y en el espacio intermembranal en mitocondria, la SOD que contiene Mn (MnSOD) que se localiza principalmente en mitocondria y la isomorfa homotetramérica extracelular (EC-SOD) (5) que contiene cuatro átomos de cobre y posiblemente 4 átomos de zinc, con un peso molecular de

aproximadamente 135 kDa. (cada subunidad pesa aproximadamente 30 kDa), y se localiza en matriz intersticial y en fluidos intravasculares y extracelulares (6,7).

La SOD no es realmente una enzima detoxificante, ya que el producto de su actividad, el peróxido de hidrógeno, es un agente tóxico. Sin embargo, la dismutación del ion superóxido es el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación completa del ion superóxido formado. El segundo paso, depende de la catalasa.

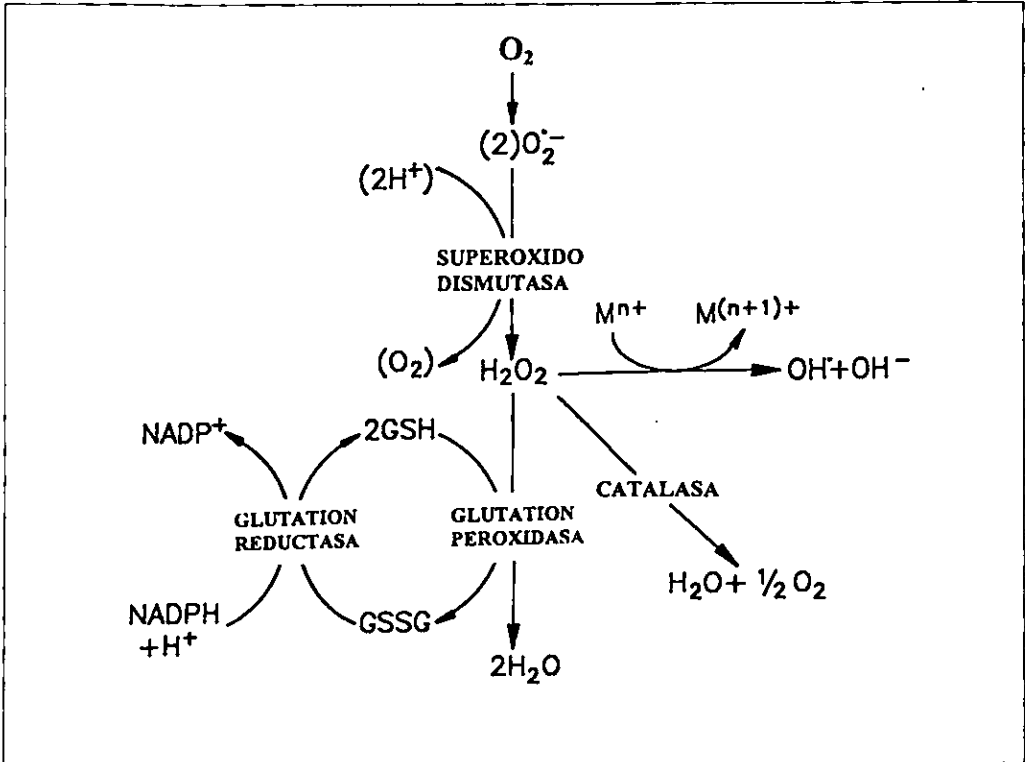


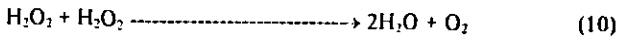
Figura 1. Cascada de las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-Px

1.2.B. Catalasa (CAT).

Esta enzima antioxidante cataliza la transformación de peróxido de hidrógeno a agua (Figura 1). La CAT (EC 1.11.1.6) es una hemoproteína homotetramérica de 240 kDa, con cuatro ferriprotoporfinas por molécula (8). Su vida media en la circulación es de 6 a 8 minutos (9). En mamíferos esta enzima está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (10). En las células se ha localizado en el citosol, mitocondrias y organitos subcelulares como los peroxisomas (los peroxisomas son abundantes en

las células epiteliales de túbulo proximal del riñón), mientras que en los eritrocitos la enzima existe en una forma soluble (8) y cataliza la siguiente reacción:

Catalasa



1.2.C. Glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Las peroxidasas son otras enzimas que catalizan la reducción de H_2O_2 por diversos donadores de electrones. Se han identificado hasta ahora cuatro tipos de GSH-Px (glutatión: H_2O_2 oxidoreductasa, EC 1.11.1.9) dependientes de selenio: a) la citosólica (cGSH-Px), b) la plasmática (pGSH-Px), c) la gastrointestinal (glGSH-Px), y d) la de fosfolípidos (PLGSH-Px).

1.2.C.1. La cGSH-P se descubrió en eritrocitos. Es una proteína tetramérica con cuatro subunidades idénticas (homotetrámero) y con un peso molecular de 84 kDa. Se ha demostrado en estudios en hígado de rata, el selenio (Se) en esta enzima está en forma de Se-Cys y es la porción catalítica de la glutatión peroxidasa (11). Cada subunidad contiene un sólo residuo de selenocisteína. La cGSH-Px es la más abundante selenoproteína en la rata y está presente virtualmente en todos los tejidos (12). La cGSH-Px tiene la función de almacenamiento del elemento traza y de antioxidante bajo condiciones donde hay relativamente grandes cantidades de H_2O_2 o hidropéroxidos de lípidos que son producidos en el citosol (13).

1.2.C.2. La pGSH-Px o extracelular es distinta de cGSH-Px en estructura, sitio de función, especificidad por el sustrato, estructura del gen y localización cromosomal (14). En humanos, la secuencia de aminoácidos de pGSH-Px es similar en un 40% a la cGSH-Px (15). En la rata, está constituida por 226 aminoácidos (16). La pGSH-Px es una proteína homotetramérica de 100 kDa (17). La K_m aparente para glutatión reducido (GSH) es 10 veces más alta que en la enzima citosólica (17). Puede metabolizar peróxido de hidrógeno e hidropéroxidos de ácidos grasos eficientemente pero metaboliza pobremente hidropéroxidos de fosfolípidos e hidropéroxidos de colesterol (18) y está presente en plasma y leche (19). Los anticuerpos producidos contra pGSH-Px purificada de plasma humano no presentan reacción cruzada con cGSH-Px (20). Es la responsable de toda la actividad peroxidasa en el plasma (17) y se cree que juega un papel clave en el sistema de defensa antioxidante del plasma (21). Se ha encontrado que la actividad de pGSH-Px está baja en el suero de pacientes con hemodiálisis y con diálisis peritoneal ambulatoria continua (22). Se ha demostrado por inmunoblot, Northern blot, clonación y estudios de hibridación *in situ* que el riñón es el principal sitio de síntesis de pGSH-Px en ratas (16), en humanos (15,23,24) y en ratones (25). Por medio de hibridación *in situ* se ha demostrado que el ARNm de pGSH-Px está presente en las células epiteliales de los túbulos proximales de riñón y en las células parietales de la cápsula de Bowman (24). También se han encontrado bajos niveles del ARNm de

pIGSH-Px por Northern blot en otros tejidos de humano como hígado, pulmón, corazón, músculo esquelético y senos (19,24). Por el contrario, en la rata, además de la abundante expresión en riñón, solo se encontró una cantidad muy pequeña en pulmón, pero no se encontró en hígado, bazo u otros tejido (16). De la secuencia de un ADNc se deduce que esta enzima tiene una secuencia señal para glicosilación en humanos, indicando que es una proteína de secreción (15,24).

1.2.C.3. La glGSH-Px es un tetrámero de 75 kDa y se localiza en citosol. Puede metabolizar peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de ácidos grasos eficientemente pero metaboliza pobremente hidroperóxidos de fosfolípidos e hidroperóxidos de colesterol (18). Por un ADNc aislado y secuenciado de células de hepatoma humano, se deduce que la enzima está constituida por 190 aminoácidos (26). Los anticuerpos para la glGSH-Px no reconocen ni a la citosólica, ni a la extracelular (26), sin embargo, las propiedades y la estructura de glGSH-Px son muy similares a la cGSH-Px. El ARNm para glGSH-Px se ha encontrado en hígado de humano y colon pero no en otros tejidos, en ratas el ARNm se ha detectado solo en el tracto gastrointestinal (27). La localización de esta isomorfa de glutatión peroxidasa, sugiere que juega un papel en la protección contra los efectos adversos de los hidroperóxidos de la dieta (27).

1.2.C.4. La PHGSH-Px es diferente de las tres isomorfas mencionadas anteriormente, ya que es un monómero de aproximadamente 20-22 kDa, tiene un mol de Se por monómero. Degrada hidroperóxidos de fosfolípidos y fosfatidilcolina hidroperóxido, los cuales no son sustratos para la GSH-Px citosólica (28), además, es menos específica con respecto a GSH como su sustrato, y está estrechamente asociada a la cara interna de la membrana (18,29,30). La actividad de PHGSH-Px se preserva en la deficiencia de Se en comparación con las otras isomorfas de glutatión peroxidasa (31). La distribución de PHGSH-Px en los tejidos es diferente, es abundante en los testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (32). También tiene un sitio de fosforilación, el cual puede tener un papel en la regulación de la actividad de la enzima (33,34).

Las cuatro isomorfas catalizan la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), el cual, a su vez, es reducido por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH (Figura 1), impidiendo así que se agoten las reservas de GSH (4,35)

1.3. OTRAS DEFENSAS CONTRA EL DAÑO OXIDATIVO

Además de las enzimas mencionadas, varios minerales como selenio, zinc y cobre, o vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocopherol (vitamina E), son esenciales para la defensa contra el daño oxidativo (36,37) debido a que actúan como cofactores de las enzimas detoxificantes o como atrapadores endógenos.

1.4. EFECTOS E IMPLICACIONES MÉDICAS DE LAS ERO

Las ERO pueden destruir bacterias, lisar células, inactivar enzimas, atacar los ácidos nucleicos e iniciar la peroxidación de los lípidos de las membranas. Esto último consiste en un conjunto de reacciones que son resultado de la interacción de las ERO con ácidos grasos poliinsaturados (38).

Hay evidencias de que las ERO intervienen en enfermedades como el cáncer, artritis reumatoide, fibrosis pulmonar, isquemia-reperfusión, insuficiencia renal aguda, rechazo al trasplante renal, glomerulonefritis aguda y nefropatías tóxicas (1,38,39). En el riñón las ERO pueden degradar la membrana basal glomerular y alterar las funciones tubulares y glomerulares (1,38-40), lo cual puede ser provocado por ciertos antibióticos.

1.5. GENERALIDADES DEL RIÑÓN

La función del riñón es eliminar de la circulación productos terminales del metabolismo y controlar la constitución de la mayor parte de los líquidos corporales. Los riñones constituyen un órgano par, se sitúan en la parte retroperitoneal y están localizados en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna vertebral de los mamíferos. Cada riñón es un órgano de estructura compleja adaptada a varias funciones biológicas esenciales. En el humano, las dimensiones medias del riñón son: 12x6x3 cm. El peso medio es de 130-170 g para el hombre y de 115-160 g para la mujer. La estructura interna de cada riñón se compone de un millón de nefronas o más, que son la unidad funcional del mismo. Cada nefrona (figura 2) está constituida por un glomérulo a través del cual la sangre se filtra y de un largo túbulo donde el líquido filtrado se convierte en orina mientras circula hasta la pelvis del riñón. El glomérulo se localiza en la corteza renal (figura 3), es una red de hasta 50 capilares paralelos cubiertos por células epiteliales que están incluidos en la cápsula de Bowman, la presión de la sangre en el glomérulo hace que se filtre el líquido hacia la cápsula de Bowman (el líquido que se filtra a través del glomérulo hacia la cápsula de Bowman recibe el nombre de filtrado glomerular, y la membrana a través de la que se realiza esta filtración se conoce como membrana basal glomerular) (41), de ahí pasa al túbulo proximal situado también en la corteza renal, después el líquido pasa al asa de Henle que se encuentra en la médula renal (figura 3) y posteriormente al túbulo distal que se encuentra de nuevo en la corteza renal y finalmente penetra en el túbulo colector que reúne el líquido de varias nefronas, para luego vaciarse en la pelvis renal. Cuando el filtrado glomerular sigue a través de los túbulos, gran parte del agua y cantidades variables de solutos se reabsorben en los túbulos, mientras que el agua y los solutos que no se reabsorben se transforman en orina (42).

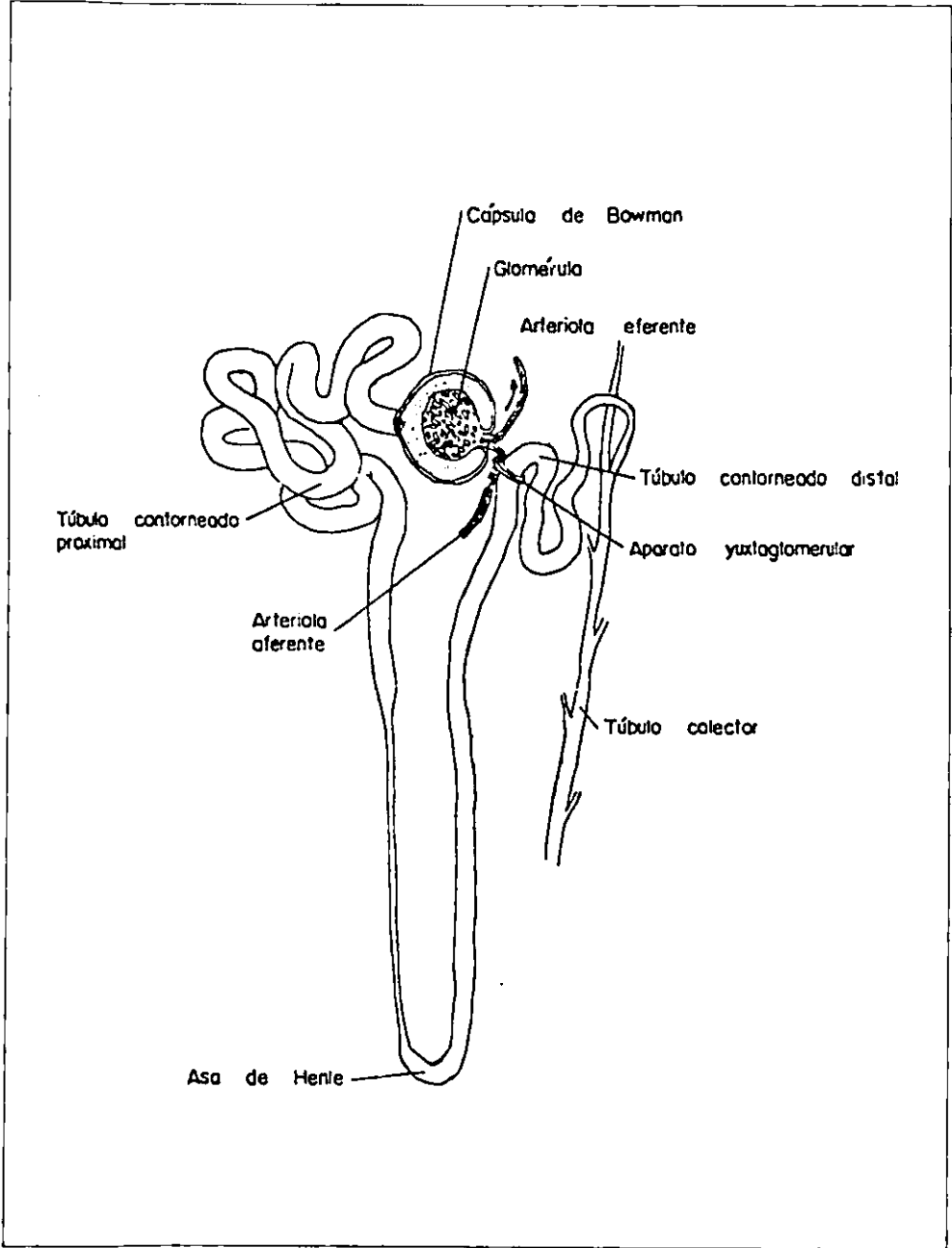


Figura 2. Estructura de nefrona.

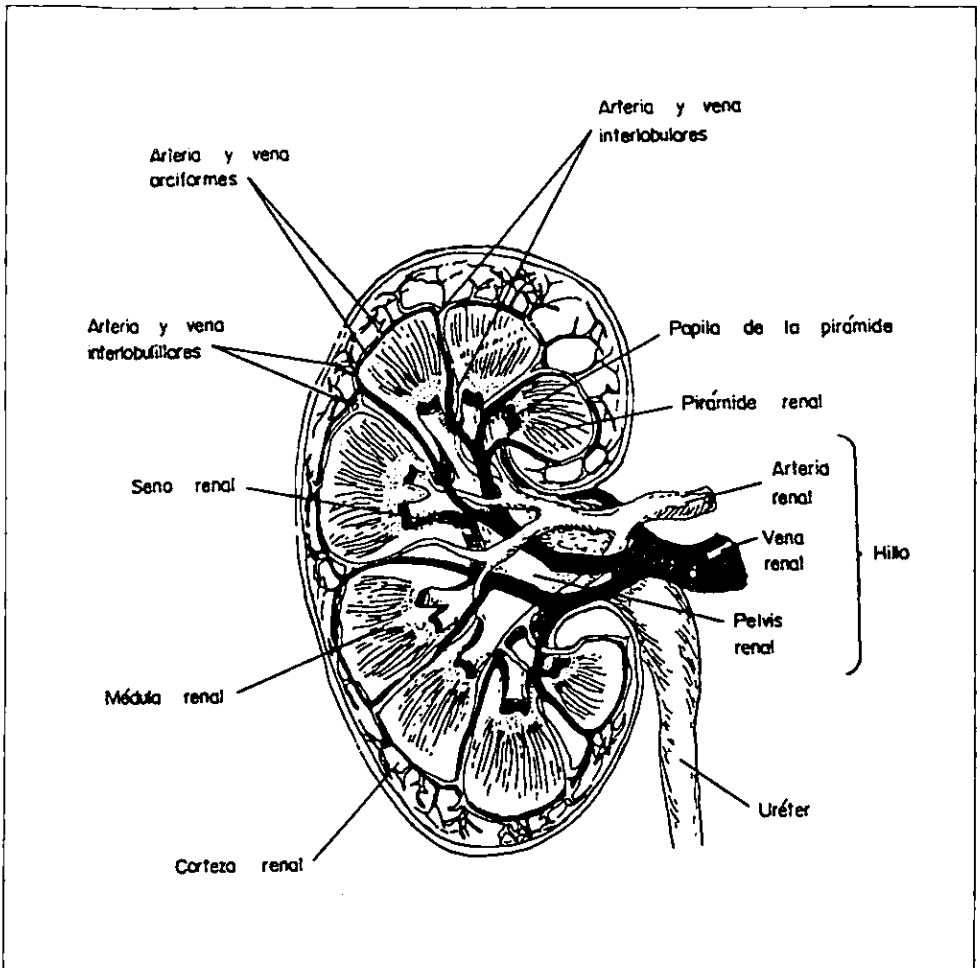


Figura 3. Estructura interna del riñón.

1.6. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA NEFROTÓXICA.

1.6.A. Insuficiencia renal aguda.

La insuficiencia renal aguda (IRA) puede definirse como una disminución abrupta de la filtración glomerular

1.6.B. Insuficiencia renal aguda nefrotóxica.

Se denominará insuficiencia renal nefrotóxica a aquella causada por drogas o tóxicos, relacionadas a la administración de: a) antibióticos y antineoplásicos (aminoglicósidos, cefalosporinas, tetraciclina, anfotericina, etc.); b) anestésicos y agentes de contraste radiológico; c) exposición accidental, laboral o criminal a metales

pesados y d) exposición a solventes orgánicos. Dada la dificultad de llevar a cabo estudios metabólicos y fisiopatológicos renales en pacientes con IRA, los modelos experimentales de esta enfermedad han sido de gran ayuda para entender lo que ocurre clínicamente. Uno de los modelos más utilizados es el inducido por la administración del antibiótico aminoglicósido GM, aunque con frecuencia es necesario utilizar dosis mayores (aproximadamente 100 mg de GM/Kg de peso por 4-7 días) para ratas, o los tratamientos deben de ser más prolongados (ver cuadro II, página 13) que las usadas clínicamente en humanos (160 mg GM/24 h durante 7 días para adultos de aproximadamente 50-70 Kg de peso) o sea más de 40 veces lo de la dosis humana.

1.6.C. Distribución de las ERO y de las enzimas antioxidantes en el riñón.

Se ha encontrado que las actividades de SOD, CAT y GSH-Px son 3 a 6 veces más altas en túbulo proximal que en glomérulo (43). De igual manera, la cantidad de enzima y de ARNm de SOD y CAT son significativamente más altas en los túbulo proximal (43). En cuanto a las ERO, la concentración de O_2^- medida por quimioluminiscencia es 10 veces más alta en glomérulos que en túbulo (43).

1.7. GENTAMICINA (GM)

Los aminoglicósidos como la netilmicina, la kanamicina, la tobramicina, la dibekacina, la amikacina y la gentamicina son antibióticos extremadamente eficaces y son ampliamente usados, contra bacterias gram-negativas, en particular de los gérmenes de fuente entérica (enterobacterias) como *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Enterobact spp.*, *Serratia marcescens* y *Salmonella spp* (44,45). Sin embargo, uno de los efectos secundarios del uso de estas drogas es la nefrotoxicidad. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los pacientes tratados con aminoglicósidos, después de 7 días, muestran señales de nefrotoxicidad (44).

La gentamicina (GM) es uno de los agentes más utilizados debido a la larga experiencia en su uso, a su bajo costo, a que induce poca resistencia, a su rápido efecto bactericida, a que es de amplio espectro así como el hecho de que se conoce muy bien su farmacología, toxicidad y propiedades terapéuticas, además provoca menos efectos secundarios y menos severos que otros bactericidas como los β -lactámicos. La GM, en general, no es tan eficiente como otros fármacos en contra de bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus spp.*, sin embargo, en situaciones especiales, puede ser de primera elección la GM asociada a penicilina, vancomicina o incluso a antibióticos específicos en contra de *Enterococcus faecalis*. Además, la GM tiene una excelente acción *in vitro* e *in vivo*, en contra de *Pseudomonas spp*. La *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista frecuente que puede ocasionar infección virtualmente en cualquier sitio de pacientes con deficiencias en su respuesta inmune. El tratamiento de las infecciones sistémicas por este microorganismo es difícil y la mortalidad es significativa (44,45).

1.7.A. Estructura química de la GM.

Está formada de tres estructuras: una hexosa central 2-desoxiestreptamina, que es un compuesto cíclico que contiene dos grupos aminicos (Figura 4). Las otras estructuras de la molécula son dos azúcares, la purpurosamina, donde existen dos grupos aminicos, uno enlazado al carbono 2 y otro al carbono 6. La garosamina, el otro aminosacárido, contiene un grupo metilamínico, en el que el grupo metilo se halla ligado al átomo de nitrógeno del grupo amino en el carbono 3. En la GM, los dos sacáridos, purpurosamina y garosamina, se ligan mediante un enlace glicosídico a la 2-desoxiestreptamina. La GM es extremadamente hidrosoluble, es estable a variaciones extremas de pH y puede soportar temperaturas y presiones de autoclave por lo menos 20 minutos. Debido a la presencia de sus grupos amino, es una sustancia básica, es un catión fuertemente polar, lo que dificulta su penetración al espacio intracelular (45).

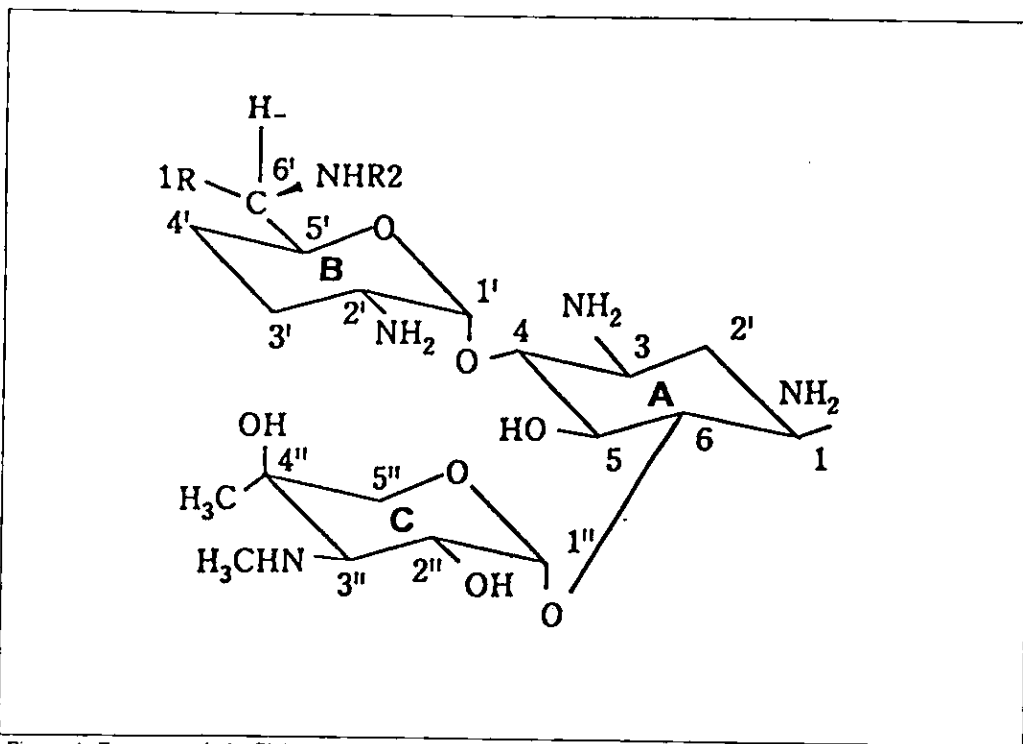


Figura 4. Estructura de la GM. Es una mezcla de tres fracciones del componente C: C1, C1a, y C2. En C1, ambos R1 y R2 = CH₃; en C1a, ambos R1 y R2 = H; en C2, R1 = CH₃ y R2 = H.

1.7.B. Mecanismo de acción de la GM.

La GM tiene una acción antimicrobiana producida por la inhibición de la síntesis proteica. En este caso, se entiende por inhibición de la síntesis proteica de la bacteria, el impedimento para formar el complejo de iniciación, así como alteraciones en la lectura del código genético, con la formación de proteínas anómalas.

efecto que finalmente causa la incapacidad de la bacteria para multiplicarse. Cuando el fármaco se ha fijado en forma irreversible al ribosoma, se interrumpe la síntesis bacteriana de proteínas y la membrana de la bacteria pierde su integridad selectiva, con fuga de minerales esenciales hacia el ambiente exterior. Si es suficientemente elevada la cantidad del fármaco que se fija y concentra dentro de la célula, se produce un efecto químico irreversible letal para la bacteria (45).

1.7.C. Farmacocinética y biodisponibilidad de la GM.

El perfil de la farmacocinética de la GM es similar a los demás aminoglicósidos. Los aminoglicósidos son rápida y completamente absorbidos después de la administración intramuscular, con niveles máximos entre 30 y 60 minutos. Tienen un volumen de distribución de cerca de 0.25 L/Kg, que se aproxima con el del comportamiento del líquido extracelular. Después de una administración endovenosa se observa una fase de distribución inicial rápida, con una vida media de cerca de 5-15 minutos. La GM se une muy poco a las proteínas séricas, no se metabolizan en el cuerpo, se excreta casi enteramente por filtración glomerular (44) y es particularmente reabsorbida por células del túbulo proximal. Aproximadamente el 85% de la dosis se excreta en la orina dentro de las 24 horas posteriores a su administración, alcanzándose concentraciones muy elevadas en la orina. En dosis posteriores hay una acumulación en la corteza renal (túbulo contorneado proximal) de 50 a 100 veces más que en el suero, relacionada con el riesgo potencial de nefrotoxicidad (45,46).

1.7.D. Toxicidad de la GM.

Los efectos colaterales de toxicidad se resumen, desde un punto de vista práctico en ototoxicidad y nefrotoxicidad.

1.7.D.1. Nefrotoxicidad.

El daño renal por GM se hace evidente por el incremento de nitrógeno de urea (BUN) (47,48), el aumento de la creatinina sérica (47,49,50) y la disminución en la depuración de creatinina (50), subsecuente a una reducción de la filtración glomerular. Las alteraciones anteriores están estrechamente asociadas con necrosis tubular (51) y aumento en la excreción urinaria de la enzima lisosomal N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) (47,49,50).

1.7.D.2. Alteraciones glomerulares producidas por GM.

No hay consenso en cuanto al mecanismo por medio del cual disminuye la filtración glomerular, sin embargo, es muy probable que éste sea de carácter multifactorial.

Se ha sugerido que la disminución en el coeficiente de ultrafiltración (Kf) (el producto de la permeabilidad hidráulica de la pared capilar y el área de filtración) después del tratamiento con GM ocurre como consecuencia de una disminución en el área de filtración extracelular de los capilares glomerulares (52). Se ha observado por microscopía electrónica de transmisión y de barrido que la GM induce en el glomérulo de ratas, reducción en el diámetro de las fenestras endoteliales (de aproximadamente un 41%) (52,53) así como la densidad y área de estas mismas (52), lo cual ocurre paralelamente a la disminución en el Kf (52). También hay una disminución en el flujo plasmático glomerular (Q_A) inicial de un 41%, que, junto con la disminución en el Kf de un 41%, induce a una disminución en la filtración glomerular por nefrona de aproximadamente 40% (54-56). Además, se ha visto que la GM solo afecta la porción endotelial de la barrera de filtración (52).

La insuficiencia renal oligúrica o anúrica por aminoglicósidos es muy rara, pero la depuración de creatinina está disminuida (45).

1.7.D.3. Alteraciones tubulares producidas por GM.

Se ha observado que en la nefrotoxicidad por gentamicina hay alteraciones funcionales y morfológicas en las células del túbulo proximal y eventualmente hay necrosis de estas mismas células. En este paso está involucrado el transporte y la acumulación de la droga en altas concentraciones por células del túbulo proximal renal y está basado en la interacción electrostática de los policationes orgánicos (la droga) con fosfolípidos aniónicos (principalmente fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) en el borde en cepillo de las células tubulares. Posteriormente, el fármaco se reabsorbe posteriormente por medio de pinocitosis y se acumula en los lisosomas de las células tubulares proximales, donde inactiva enzimas como la fosfolipasa A, fosfolipasa C y la esfingomielinasa, causando una acumulación de fosfolípidos e interfiriendo con la función normal de los lisosomas (57). La absorción neta de la GM por el riñón da como resultado una alta concentración del fármaco dentro de la corteza renal. Mientras que la vida media en el suero está en el rango de algunas horas, el rango de vida media en el tejido renal es al nivel de cientos de horas (más de un mes) (45). Sin embargo, la acumulación del antibiótico en el túbulo no necesariamente correlaciona con su nefrotoxicidad. Se ha informado que algunos agentes (por ejemplo, SOD que es una enzima antioxidante y la dimetilurea que es un atrapador de radicales libres) protegen contra la nefrotoxicidad por GM, aunque esto no disminuye la concentración de GM renal (47). Por otro lado, la disminución de la GM acumulada en el riñón no es siempre indicador de protección. Por ejemplo, en ratas tratadas concomitantemente con GM y 5-piridoxal-fosfato, los niveles de GM renal se redujeron aproximadamente un 40% comparado con ratas tratadas solo con GM. Esto sin embargo, no se asoció con protección contra GM (58). La GM también induce pérdida del área superficial basolateral de los túbulos contorneados proximales de rata (59)

1.7.D.4. Otras alteraciones producidas por GM.

Se ha visto que la GM en las mitocondrias de la corteza renal induce alteraciones: a) en la permeabilidad de la membrana (60), b) en el transporte de calcio (60,61), c) en la respiración(62), d) e inhibe la fosforilación oxidativa *in vivo* e *in vitro* (63). Además hay hinchamiento de estas mismas mitocondrias (64,65), debido a que se llenan de citosol. Se ha demostrado *in vitro* que la GM incrementa la generación de peróxido de hidrógeno por la mitocondria de corteza renal de rata (66) con la probable generación de otras ERO, las cuales pueden alterar procesos intracelulares. Se ha demostrado que la GM induce la liberación de hierro de mitocondrias de corteza renal de rata, mediado esto por la generación de peróxido de hidrógeno (67). Estos datos indican que la mitocondria puede servir como una importante fuente de hierro, el cual al formar un complejo con la GM (68) induce la formación de ERO (en particular OH⁻), las cuales pueden iniciar lipoperoxidación en riñón de rata (69) hay hinchamiento debido a que se llenan de citosol.

Por otro lado, la bomba de sodio y potasio dependiente de ATP se altera como parte del daño renal inducido por la GM (70). También se ha observado que el diámetro de las arteriolas aferentes de las ratas tratadas con GM, parecen estar ligeramente más pequeñas en la corteza externa (aproximadamente un 13%) (53).

1.8. EVIDENCIAS DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS ERO EN LA NEFROTOXICIDAD POR GM

Como se ha visto, el daño al riñón inducido por GM se ha estudiado mucho. Sin embargo, el mecanismo exacto de la nefrotoxicidad por GM aun se desconoce a pesar de que muchos estudios se han enfocado a investigar esto, así como diferentes tratamientos que aminoren o eviten dicho daño renal. Como resultado de todos estos estudios se han encontrado evidencias que sugieren que las ERO participan en el mecanismo de la nefrotoxicidad por GM.

- La adición de GM aumenta la producción mitocondrial de aniones superóxido (71,72) y radicales hidroxilo *in vitro* (71).
- La adición de la enzima catalasa a estas mismas mitocondrias, inhibe significativamente el incremento de los radicales libres (71).
- La GM aumenta la producción *in vitro* de peróxido de hidrógeno de mitocondrias de corteza renal. Lo anterior sugiere que la producción del anión superóxido también aumenta, ya que el peróxido de hidrógeno es producto de la dismutación de superóxido (66).
- La lipoperoxidación aumenta en la corteza renal de ratas inyectadas con GM (47,49,50,73).
- La administración de SOD a ratas tratadas con este antibiótico, mitigó la nefrotoxicidad, probablemente por la inhibición de la acción de los aniones superóxido (47,74).

- También se ha demostrado que la deferoxamina, un quelante de Fe, tiene un efecto protector en el daño renal inducido por GM, esto se ha tomado como evidencia de la participación de los radicales hidroxilo en el daño del tejido, ya que el Fe es crítico en la generación de radicales hidroxilo (vía reacción Haber-Weiss) (48).
- La formación de complejos hierro-gentamicina causa lipoperoxidación *in vitro* y es un potente catalizador de la formación de radicales libres (68).
- Se ha encontrado que atrapadores de radicales hidroxilo como la dimetiltiourea (47,48) o metalotioneína (75) también tienen efecto protector.

I.9. ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL MODELO DE NEFROTOXICIDAD POR GM

Se ha estudiado también el comportamiento de las enzimas antioxidantes en el riñón de diferentes organismos tratados con GM. Se ha encontrado que la actividad de la enzima catalasa de corteza renal de ratas tratadas con GM, disminuye en comparación a los valores de los controles (47,49,50,73,76) y que la inhibición de esta actividad es, posiblemente, la responsable de la iniciación del ataque de los radicales libres a ácidos grasos poliinsaturados (73). La actividad de la SOD no muestra alteraciones consistentes en la nefrotoxicidad por GM (Cuadro I). Y en cuanto a la glutatión peroxidasa no se tienen datos del comportamiento de su actividad en ratas con nefrotoxicidad por GM (Cuadro I). Además no se han realizado estudios en los cuales relacionen la actividad de estas enzimas con la cantidad de proteína y los niveles de ARNm.

Cuadro I. Actividad de las enzimas antioxidantes en la nefrotoxicidad inducida por GM.

AUTORES	Organo/especie	SOD U/mg proteína	GSH-Px U/mg proteína	CAT κ/mg proteína
Nakajima <i>et al.</i> , 1994 (47).	riñón/rata	≈	-	-
Ramsammy <i>et al.</i> , 1989 (50).	riñón/rata	-	-	↓ 38%
Ramsammy <i>et al.</i> , 1987 (77).	riñón/rata	↓ 44%	-	↓ 54%
Ramsammy <i>et al.</i> , 1985 (73).	riñón/rata	≈	-	↓ 30%
Ramsammy <i>et al.</i> , 1986 (49).	riñón/rata	≈	-	↓ 27%
Sandhya <i>et al.</i> , 1997 (78)	riñón/rata	↓	-	↓

≈ No cambian significativamente con respecto al control

I.10. CARACTERÍSTICAS DEL AJO (*Allium sativum*)

El ajo ha sido muy empleado no solo como un condimento sino también por sus propiedades profilácticas y curativas (79). El ajo fresco tiene un alto contenido de selenio (Se) (0.276 µg Se/g) en comparación con otros

vegetales, por ejemplo, los hongos, las cebollas, los tomates y las papas frescas tienen 0.122, 0.015, 0.005 y 0.007 $\mu\text{g Se/g}$ respectivamente (80). El Se es un micronutriente esencial, requerido para la función correcta del sistema inmune y para defender a la célula contra el daño oxidativo (81). El ajo también tiene un alto contenido de compuestos sulfurados como dialil sulfuro, dialil disulfuro, alina (S-alil cisteína sulfóxido) y alicina (79,81). Se ha encontrado que el ajo posee propiedades anticoagulantes (82), antibacterianas (83), antioxidantes (84-93), hipolipemiantes (94-97) y anticarcinogénicas (98-100). Los siguientes datos son una evidencia de que el ajo en polvo o sus extractos acuosos o alcohólicos tienen propiedades antioxidantes: (a) previenen la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico durante la peroxidación de lípidos de microsomas hepáticos de rata (84), (b) reducen los radicales generados por la reacción de Fenton y atrapados por alfa tert butil nitrona (85), (c) atrapan radicales hidroxilo generados por fotólisis de H_2O_2 con luz UV y previenen la formación de malondialdehído inducido por radicales hidroxilo en homogenados de hígado de conejo (86), (d) confieren protección del daño causado por isquemia y reperfusión cardíaca (87) y cerebral (88), (e) protege del daño cromosomal inducido por radiaciones gamma (89), y (f) inhibe la oxidación de las LDL inducida por Cu^{+2} *in vitro* (90). No se han determinado cuántas son las sustancias que le confieren propiedades antioxidantes al ajo, pero se ha encontrado que la alicina funciona como un atrapador de radicales hidroxilo (91), que la S-alil cisteína sulfóxido (alina) disminuye el contenido de malondialdehído, de hidroperóxidos y de dienos conjugados en hígado y riñón y aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en hígado de ratas diabéticas (92), y que S-alil cisteína y S-alil mercaptocisteína, compuestos sulfurados encontrados en los extractos envejecidos de ajo, inhiben la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico iniciada por t-butilhidroperóxido en microsomas hepáticos (93).

El ajo se ha administrado en diferentes maneras a las ratas: (a) como polvo, mezclado con el alimento a diferentes porcentajes 0.8% (98), 2% (85,94,99), 3.8% (100) y 5% (101,102), (b) como extractos acuosos crudos a diferentes dosis (25 a 500 mg/Kg) en forma intragástrica durante 6-30 días antes de la administración de los tóxicos (89,103,104) o como extractos envejecidos de manera intraperitoneal, 30 minutos antes de la isquemia (88). Además, se ha comprobado la estabilidad térmica de los extractos de ajo ya que su capacidad de atrapar OH^{\cdot} sólo disminuyó en un 10% cuando se sometieron a temperaturas altas, característica que le confiere al ajo una mayor versatilidad de uso sin perder por ello sus propiedades (86).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a la información presentada, se puede observar que la GM es muy utilizada en el tratamiento contra bacterias gram-negativas. Sin embargo, este medicamento induce nefrotoxicidad como un efecto secundario. La nefrotoxicidad por GM se ha estudiado ampliamente y los resultados de estos estudios indican que las ERO están implicadas en este daño renal. Los estudios realizados hasta el momento, en este modelo de nefrotoxicidad por GM, se han enfocado a la medición de las actividades de algunas enzimas antioxidantes y no se han visto aspectos de regulación a nivel de la cantidad de proteína y de ARNm.

Si se encontrara el modo de eliminar o disminuir la nefrotoxicidad, aumentaría la utilidad clínica de este antibiótico. Y dadas las propiedades antioxidantes del ajo, a su bajo costo y extendido uso, se hace muy atractivo estudiar sus posibles efectos protectores en este daño renal. Por lo tanto, la información que se genere de este trabajo puede ser útil para intentar desarrollar estrategias que reduzcan o prevengan la nefrotoxicidad inducida por la GM.

III. HIPÓTESIS

Al participar las ERO en la nefrotoxicidad inducida por GM, es probable que estas especies alteren la expresión de las enzimas antioxidantes en el riñón de rata. Además, de acuerdo a las propiedades antioxidantes del ajo, se espera que la alimentación con una dieta enriquecida con ajo prevenga o aminore la nefrotoxicidad por la GM. Es posible también que el ajo altere las defensas enzimáticas antioxidantes de la rata, modificando la actividad y, probablemente, la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a la información presentada, se puede observar que la GM es muy utilizada en el tratamiento contra bacterias gram-negativas. Sin embargo, este medicamento induce nefrotoxicidad como un efecto secundario. La nefrotoxicidad por GM se ha estudiado ampliamente y los resultados de estos estudios indican que las ERO están implicadas en este daño renal. Los estudios realizados hasta el momento, en este modelo de nefrotoxicidad por GM, se han enfocado a la medición de las actividades de algunas enzimas antioxidantes y no se han visto aspectos de regulación a nivel de la cantidad de proteína y de ARNm.

Si se encontrara el modo de eliminar o disminuir la nefrotoxicidad, aumentaría la utilidad clínica de este antibiótico. Y dadas las propiedades antioxidantes del ajo, a su bajo costo y extendido uso, se hace muy atractivo estudiar sus posibles efectos protectores en este daño renal. Por lo tanto, la información que se genere de este trabajo puede ser útil para intentar desarrollar estrategias que reduzcan o prevengan la nefrotoxicidad inducida por la GM.

III. HIPÓTESIS

Al participar las ERO en la nefrotoxicidad inducida por GM, es probable que estas especies alteren la expresión de las enzimas antioxidantes en el riñón de rata. Además, de acuerdo a las propiedades antioxidantes del ajo, se espera que la alimentación con una dieta enriquecida con ajo prevenga o aminore la nefrotoxicidad por la GM. Es posible también que el ajo altere las defensas enzimáticas antioxidantes de la rata, modificando la actividad y, probablemente, la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes.

IV. OBJETIVOS GENERALES

- 1.- Determinar las posibles alteraciones en la expresión renal de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa citosólica y glutatión peroxidasa plasmática en la nefrotoxicidad inducida por GM.
- 2.- Investigar si la alimentación con ajo tiene efecto protector sobre la nefrotoxicidad inducida por la GM. y si altera la expresión de catalasa, glutatión peroxidasa citosólica y glutatión peroxidasa plasmática

IV.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar el daño renal inducido por la GM en ratas y si el ajo tiene un efecto protector sobre el daño renal, realizando las siguientes determinaciones: a) Proteinuria, b) depuración de creatinina, c) fracción excretada de sodio, d) nitrógeno de urca en plasma y e) excreción urinaria de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa
- 2.- Evaluar el estrés oxidativo renal midiendo lipoperoxidación y estudiar si el ajo disminuye la lipoperoxidación.
- 3 - Evaluar la expresión renal de la enzima CAT y estudiar si el ajo modifica esta expresión.
 - a) midiendo la actividad, la cantidad de proteína y los niveles de ARNm de la enzima CAT en corteza y médula renal
- 4 - Medir la actividad de la isomorfa cGSH-Px en corteza y médula renal y estudiar si el ajo modifica esta actividad
- 5 - Medir la actividad en plasma de la isomorfa pGSH-Px y determinar si el ajo modifica esta actividad

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se realizó en ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 150-200 g de peso del bioterio de la Facultad de Química UNAM, que se dividieron en 4 grupos: control (CT), gentamicina (GM), control alimentado con ajo (A) y gentamicina alimentado con ajo (GM+A). Cada grupo estuvo constituido por 8 ratas. La GM se administró cada 12 horas durante 6 días subcutáneamente en una dosis de 75 mg/Kg. Los animales se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar, cada tercer día, la orina de 24 horas para medir la excreción de proteínas totales y de la enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa. Además, en la orina y en el plasma que se recogieron el día del sacrificio (día 7), se midió la concentración de creatinina y de sodio para calcular el cociente creatinina orina/creatinina plasma (un índice de la reabsorción tubular de agua), la depuración de creatinina y la fracción excretada de sodio. En plasma, también se determinó nitrógeno de urea (BUN) y la actividad de pGSH-Px. Los riñones se obtuvieron y se dividieron en médula y corteza para determinar en ambas porciones la actividad, la cantidad de proteína y los niveles de ARNm de CAT y la actividad de cGSH-Px. Paralelamente, se midió la lipoperoxidación en corteza renal, un marcador de estrés oxidativo. En los tejidos de corteza renal que se obtuvieron, se realizaron estudios histológicos y se determinó la concentración de GM.

V.1. DIETAS

Se compró ajo en polvo (McCormick México D.F.), el cual se mezcló con el alimento pulverizado (Nutricubos de purina) a una concentración de 2% (105) y con este se alimentaron las ratas de los grupos correspondientes. La única diferencia entre las dos dietas que se administraron, fue la presencia de ajo. La alimentación con ajo al 2% se inició 14 días antes de la administración de la GM.

V.2. DETERMINACIONES DE BIOQUÍMICA CLÍNICA EN SUERO, ORINA Y RIÑÓN.

*Las proteínas totales en homogenizados de médula y de corteza se determinaron espectrofotométricamente por el método de Lowry *et al* (106).

*Las proteínas totales en orina se midieron por un método turbidimétrico, usando ácido tricloroacético (TCA) (107). Se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente 250 µl de TCA al 12.5% con 1 ml de orina diluida previamente 1:5 con solución salina. La absorbencia se leyó a 420 nm. Se preparó un blanco para cada muestra que contenía 1 ml de orina diluida y 250 µl de solución salina. Las absorbencias se interpolaron en una curva estándar en el rango de 0.04 a 0.8 mg/ml de una solución de albúmina sérica bovina al 0.1%. Los datos se expresan en mg de proteínas/24 h.

*El nitrógeno de urea en plasma. La concentración de urea se determinó por el método cinético UV mediante el estuche comercial UREA MPR2 de Boehringer Mannheim (Alemania). La urea presente en la muestra se hidroliza por la ureasa a amonio y CO₂. En una reacción acoplada, el α-cetoglutarato y el NADH presentes en

la misma mezcla de reacción, reaccionan utilizando el amonio producido por la ureasa, convirtiendo el α -cetoglutarato a L-glutamato por la glutamato deshidrogenasa. El consumo de NADH disminuye la absorbencia a 340 nm y esta disminución es directamente proporcional a la cantidad de urea presente en la muestra

*La creatinina en plasma y en orina se determinaron a través de la reacción de Jaffé utilizando un estuche comercial de Lakeside (México). Un método de punto final donde se desproteinizan las muestras. En esta reacción, la creatinina forma un complejo colorido con picrato en medio alcalino. El producto formado absorbe a 520 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina, presente en la muestra.

*El sodio urinario y plasmático se midió por el método de flamometría.

V.3. LIPOPEROXIDACIÓN POR EL METODO DE OHKAWA.

Para determinar el índice de lipoperoxidación se cuantificaron los niveles de uno de sus productos finales, el malondialdehído, sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se empleó el método de Ohkawa *et al.* (108) Las mediciones se realizaron en orina de 24 h en plasma y en homogenizado de riñón obtenidos el día del sacrificio. Los riñones se lavaron con NaCl al 0.9% y se homogenizaron en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.0 con Tritón X-100 al 1% en una proporción de 1:10. El homogeneizado se filtró a través de gasa. Se incubaron 100 μ l del filtrado a 95°C en un baño de aceite durante 1 hora con la siguiente mezcla de reacción: 0.2 ml de dodecil sulfato de sodio al 8.1%, 1.5 ml de ácido acético al 20% pH 3.5, 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y 0.7 ml de agua destilada. Al término de la incubación los tubos se enfriaron y a cada uno se le agregó 1 ml de agua destilada y 5 ml de una mezcla de n-butanol:piridina (15:1 vol/vol) La mezcla se agitó y se centrifugó durante 15 minutos a 2,000 g. Se determinó espectrofotométricamente la absorbencia de la capa orgánica a 532 nm. Los resultados se obtuvieron interpolando la absorbencia de las muestras problema en una curva patrón utilizando al 1,1,3,3-tetrametoxipropano como estándar. La lipoperoxidación se expresó como nmoles de MDA/mg de proteína.

V.4. LIPOPEROXIDACIÓN CON UN ESTUCHE COMERCIAL.

La lipoperoxidación en corteza renal se determinó utilizando un estuche comercial de Calbiochem (San Diego). Es un ensayo colorimétrico específico para malondialdehído (MDA) y para 4-hidroxi-2(E)-nonenal (4-HNE), los cuales son productos finales de la lipoperoxidación. Este estuche contiene un reactivo cromogénico (N-metil-2-fenilindole) que reacciona con MDA y 4-hidroxi-2(E)-nonenal a 45°C. En la reacción hay una condensación de una molécula de MDA o 4-hidroxi-2(E)-nonenal con dos moléculas del reactivo cromogénico, produciendo un cromóforo estable que tiene una absorbencia máxima a 586 nm.

V.5. DETERMINACIONES ENZIMATICAS

V.5.A. Actividad de la glutatión peroxidasa citosólica en médula y corteza. Se empleó el método de Lawrence y Burk (109) en el cual la cGSH-Px presente en el homogeneizado catalizó la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), el cual a su vez, es reducido por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH (Figura 1 página 4), la oxidación de este último se detecta a una longitud de onda de 340 nm (4,35).

Los riñones se lavaron con NaCl al 0.9%, se dividieron en médula y corteza y cada fracción se homogenizó en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.0 con Tritón X-100 al 1% en una proporción de 1:10. El homogeneizado se centrifugó a 105,000 x g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se diluyó 1:10 y 100 µl de ésta dilución se mezclaron con 800 µl de la siguiente solución: fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 unidad de glutatión reductasa/ml y glutatión reducido 1 mM. Se preparó un blanco con la muestra de reacción añadiendo agua destilada y no el sobrenadante del homogenado. Después de 5 minutos de incubación de la muestra con el amortiguador a temperatura ambiente, se agregaron 0.1 ml de H₂O₂ 0.25 mM a cada muestra e inmediatamente se leyó la absorbencia a 340 nm cada minuto durante 3 minutos. La actividad de la GSH-Px se determinó promediando los cambios de absorbencia por minuto y multiplicando este promedio por 0.16, este factor se obtuvo tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm es de 6.22x10⁶. Finalmente se dividió este resultado entre los mg de proteína. Los datos se expresaron como U/mg de proteína (U = µmoles de NADPH oxidado/minuto).

V.5.B. Actividad de la glutatión peroxidasa plasmática.

Se empleó el mismo método que para riñón, solo que aquí se utilizaron 0.1 ml de plasma diluido previamente, en una proporción de 1:8 en lugar de homogeneizado de riñón.

V.5.C. Actividad de catalasa en médula y corteza.

Se determinó usando el método de Aebi (110), en el cual la desaparición del peróxido de hidrógeno que absorbe a 240 nm. Las médulas y las cortezas se lavaron, se homogeneizaron y se centrifugaron de la misma manera que para glutatión peroxidasa. En una celdilla de cuarzo de 1.6 ml se adicionaron 25 µl del homogeneizado diluido (1:33 en el caso de la corteza y para médula de 1:3) y 725 µl de peróxido de hidrógeno 7.7 mM en un amortiguador de fosfato 10 mM pH 7. Se midió el cambio de absorbencia a 240 nm cada 15 segundos durante 30 segundos, que es el período en que la descomposición del peróxido de hidrógeno sigue una cinética de primer orden. La diferencia entre las densidades ópticas dadas a los 0 y 15 seg no debe ser menor de 0.02 (indica que el homogeneizado está muy diluido), ni mayor de 0.2 (indica que el homogeneizado está muy concentrado).

De acuerdo a Acbi, se usó la constante de reacción de primer orden (κ) como la unidad de actividad de la catalasa la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula

$$\begin{aligned} \kappa &= (1/\Delta t)(\ln A_1/A_2) && \text{Donde } \Delta t = t_2 - t_1 \\ &= (2.3/\Delta t)(\log A_1/A_2) && A_1, A_2 = \text{absorbencia del H}_2\text{O}_2 \\ &= (2.3/15)(\log A_1/A_2) && \text{en los tiempos } t_1 \text{ y } t_2 \\ &= (0.153)(\log A_1/A_2) \end{aligned}$$

La actividad se expresa como κ /mg de proteína.

V.5.D. Actividad de N-acetil- β -D-glucosaminidasa en orina.

Esta enzima es un marcador de daño a túbulo proximal (111,112) y aumenta en la nefrotoxicidad por gentamicina. La actividad se midió usando p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminido como sustrato, liberándose el p-nitrofenol, el cual se midió espectrofotométricamente a 405 nm (111,113)

En tubos de ensaye se colocó una mezcla de reacción que contenía 0.75 ml de amortiguador de citratos 0.05 M a pH 4.4, 0.25 ml de sustrato 6.8 mM y 0.1 ml de orina sin diluir. Para cada muestra se preparó un blanco con orina y amortiguador de citratos y también se preparó un blanco de comparación con amortiguador, sustrato y agua destilada. Los tubos se agitaron, se taparon y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 1.1 ml de Na₂CO₃ 0.2 M a pH 10.4. La absorbencia se midió a 405 nm. Bajo estas condiciones la producción de p-nitrofenol fue lineal contra tiempo y cantidad de orina. Las absorbencias obtenidas se interpolaron en una curva estándar de p-nitrofenol 0.6 mM en el rango de 4.68 a 150 nM, realizadas a partir de una solución de p-nitrofenol 0.6 mM. La actividad de esta enzima se expresó como U/24 h. Una unidad de NAG se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol en 15 min

V.6. SÍNTESIS DE LA SONDA DE CAT

Los oligonucleótidos que se emplearon en la síntesis del ADNc (sonda) de CAT por RT-PCR se diseñaron con el programa de cómputo Oligo Primer Analysis Software V 5.0 (National Bio Incorporation Plymouth, Minnesota.), basándose en las secuencias obtenidas del banco de datos NCBI y utilizando un sintetizador de oligonucleótidos OLIGO 100 ADN de Beckman Instruments Inc. (Fullerton, CA, USA)

El cebador superior para CAT fue 5'CCG ACG AGA TGG CAC ACT TTG ACA 3' (24 pb), y el cebador inferior fue 5'CGC GAG CAC GGT AGG GAC AGT TC3' (23 pb).

La sonda se sintetizó por RT-PCR (Apéndice 1). El ARN total de riñón se aisló por el método de TRIzol (Gibco BRL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Apéndice 2). El producto de la PCR se corrió en electroforesis en agarosa al 1.5% a 50 Volts durante 1.5 horas a temperatura ambiente para comprobar su tamaño. La sonda se aisló por electroelucion.

El producto de la RT-PCR fue de 975 nucleótidos de largo de la posición 256 a la 1208 del ARNm.

V.7. DETERMINACIÓN DEL ARNm DE CAT

El ADNc (sonda específica) obtenido se utilizó para determinar los niveles de los ARNm de CAT por la técnica de Northern blot

V.7.A. Extracción y electroforesis del ARN total.

El ARN total de corteza y médula se aisló por el método de TRIzol (Gibco BRL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Apéndice 2) y se leyó a 280 y 260 nm para obtener la concentración del ARN y el cociente de las lecturas (260/280) que indica la calidad del ARN (valores de 1.6-1.9 se tomaron como buena calidad). La concentración final del ARN fue de 5 µg/µl.

Posteriormente las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 55 Volts, durante 4 horas a temperatura ambiente. A cada pozo del gel se le colocaron 10 µg de ARN mezclado con una solución desnaturizante que contenía 10 µl de formamida, 2 µl de MOPS 10X (Apéndice 2), 4 µl de formaldehído, 2 µl de azul de bromofenol y 0.32 µl de bromuro de etidio (10 ng/ml). Después, el ARN se transfirió a una membrana de nylon "Nylon Membranes, positively charged" (Boehringer Mannheim, Alemania), obteniéndose el negativo. Se fijó el ARN a la membrana con rayos UV en un crosslinker "CL-1000 Ultraviolet Crosslinker UVP" (Lans Scientific CO. Illinois), se dejaron secar perfectamente y se almacenaron en bolsas de plástico a 4°C hasta su uso

V.7.B. Northern blot.

Para detectar el ARNm se utilizó el estuche "Dig High Prime DNA Labeling and Detection" Starter Kitt II (Boehringer Mannheim, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Apéndice 3).

Este sistema no radioactivo usa digoxigenina (DIG), el cual es un esteroide hapteno, para marcar DNA, RNA u oligonucleótidos para hibridación y detección por color o luminiscencia.

La sonda de CAT se marcó con la DIG que estaba acoplada a dUTP vía marcador alcalino. La sonda ya marcada se hizo hibridar con el ARN fijado en las membranas de nylon. La detección inmunológica se realizó con un antiDIG acoplado a Fosfatasa alcalina y son después visualizados con el sustrato quimiluminiscente CSPD. La desfosforilación enzimática de CSPD por la fosfatasa alcalina emite luz en una longitud de onda máxima de 447 nm la cual es registrada en una placa de rayos X

V.7.C. Determinación de las unidades relativas densitométricas.

Mediante un programa de cómputo llamado Sigma Scan-Pro, se determinó en el negativo de la fotografía tomada a la membrana recién transferida y en la placa de autorradigrafía del Northern Blot la intensidad y el

área de la banda que corresponde a la fracción 18S del ARN y la banda que correspondía al ARNm de CAT, respectivamente. Esto se hizo para cada muestra, expresando los resultados como unidades densitométricas. Con estos dos datos se calculó el cociente "unidades densitométricas de la autorradiografía/unidades densitométricas del 18S en el negativo = Unidades relativas densitométricas". Este cociente se realizó para corregir por la cantidad de ARN total colocado en cada pozo (114).

V.8. DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA DE CAT

La cantidad de proteína de la CAT se determinó por el método de Western blot, utilizando los anticuerpos comerciales anti-CAT de Calbiochem (San Diego, CA).

V.8.A. Extracción de proteínas totales.

Se homogenizaron 100 mg de corteza o de médula renal en 300 μ l de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) que contenía un coctel de antiproteasas (leupeptina 5 μ g/ml, pepstatina 7 μ g/ml y aprotinina 5 μ g/ml) y EDTA 1 mM.

Se midió el contenido de proteína en los homogeneizados por el método de Lowry (106) y se hicieron alícuotas con una concentración de 5 μ g/ μ l.

V.8.B. Western blot.

Se utilizó el estuche comercial "ECL Western blotting analysis system" de Amersham Life Sciences (Inglaterra) (apéndice 4). Este sistema es un método que emite luz para la detección de antígenos específicos inmovilizados, conjugado con un anticuerpo marcado con la peroxidasa de rábano.

Las proteínas fueron separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con el anticuerpo primario (anti-CAT) y posteriormente con el anticuerpo secundario (anti-Ig) acoplado a la peroxidasa de rábano. La membrana se cubrió con una mezcla que contenía luminol y un amplificador para que la peroxidasa de rábano catalizara la oxidación del luminol y se produjera emisión de luz (quemiluminiscencia). La señal de luz producida se registró en una placa de rayos X que luego se sometió a densitometría.

Los datos de densitometría se obtuvieron utilizando un analizador de imágenes Eagle Eye de Stratagene, este programa da los resultados en píxeles (unidades de luz). Los datos se expresan como porcentaje de cambios respecto a los controles (% de cambio).

V.9. ESTUDIOS DE HISTOLOGÍA EN CORTEZA RENAL

Se tomaron muestras de corteza renal para análisis de histología. La muestra de corteza se fijó con un ml de solución de formaldehído al 10%, después se deshidrató gradualmente en alcohol y se embebió en parafina. Posteriormente se obtuvieron cortes de 3 μm de grosor los cuales se tiñeron con eosina/hematoxilina.

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

V.10. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GM EN CORTEZA RENAL

La gentamicina se midió en homogeneizado de corteza renal con un inmunoensayo de fluorescencia polarizada, empleando el sistema TDX-GM de laboratorios Abbot (Abbot Park, IL). El homogeneizado renal se diluyó en amortiguador TDX para obtener concentraciones entre 3 y 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se hizo una curva patrón a partir de los siguientes estándares de gentamicina: 0.0, 0.5, 1.5, 3.0, 6.0 y 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El porcentaje de recuperación de GM del homogeneizado renal fue de $98.2 \pm 7.8\%$. Los resultados se interpolaron en la curva y el contenido de gentamicina en corteza se expresó como μg de gentamicina/mg de proteína.

V.11. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron por ANOVA y comparaciones múltiples usando la prueba de *t* de Bonferroni, mediante el programa Prisma 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) y se presentaron como la media \pm DE. Los resultados obtenidos del contenido renal de gentamicina y del análisis histológico se analizaron con una *t de Student* no pareada. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

VI. RESULTADOS

Primeramente se tenían que encontrar las condiciones adecuadas con las cuales inducir nefrototoxicidad con gentamicina. De acuerdo a la literatura se había encontrado que hay diferentes maneras de inducir esta nefrototoxicidad (Cuadro II) y nosotros probamos cuatro modelos (Cuadro III).

Cuadro II. Esquemas de inducción de nefrototoxicidad por gentamicina usados por varios autores.

ESPECIE	CEPA	SEXO	PESO (g)	DOSIS/ DURACION	VIA ADMON.	AUTORES
RATA	Sprague-Dawley	MACHO	200-250	100 mg/Kg/día 4 días	subcutánea	Ramsammy <i>et al.</i> , 1986 (49)
RATA	Sprague-Dawley	MACHO	200-220	100 mg/Kg/día 6 días	subcutánea	Ramsammy <i>et al.</i> , 1989 (50)
RATA	Sprague-Dawley	MACHO	240-280	40 mg/Kg/día. 13 días	subcutánea	Nakajima <i>et al.</i> , 1994 (47)
RATA	Sprague-Dawley	MACHO	275-300	100 mg/Kg/día. 4 días	subcutánea	Weinberg, 1985 (115)
RATA	Sprague-Dawley	MACHO	200-250	100 mg/Kg/día. 8 días	subcutánea	Walker y Shah, 1988 (48)
CUYO		MACHO	450 aprox.	200 mg/Kg/día. 10 días	intra- muscular	Kavutcu <i>et al.</i> , 1996 (37)
RATA	Sprague-Dawley	MACHO	180-200	100 mg/Kg/día. 8 días	subcutánea	Stratta <i>et al.</i> , 1994 (116)
RATA	Sprague-Dawley	MACHO	180-200	150 mg/Kg/día. 8 días	subcutánea	Stratta <i>et al.</i> , 1994 (116)
RATA	Wistar	MACHO	210 aprox.	80 mg/Kg/día. 6 días	subcutánea	Ali y Bashir, 1996 (74)
RATA	Fisher	MACHO	150-180	20-180 mg/Kg/ 12 h.	intra-peritoneal	Elfarra <i>et al.</i> , 1994 (51)
RATA	Sprague-Dawley	HEMBRA	175-200	30 mg/Kg/12 h. 10 días	intra- peritoneal	Thibault <i>et al.</i> , 1995 (117)

Cuadro III. Modelos de nefrotoxicidad probados por nosotros.

MODELO	TRATAMIENTO
1	100 mg GM/Kg peso/24 h. Durante 8 días
2	50 mg GM/Kg peso/12 h. Durante 8 días
3	75 mg GM/Kg peso/12 h. Durante 8 días
4	75 mg GM/Kg peso/12 h. Durante 6 días

VI.1. MODELO 1. Con la finalidad de caracterizar el modelo y estandarizar algunas técnicas, se decidió probar primero el esquema usado por Walker y Shah de 1988 (48) que fue de 100 mg GM/Kg/día durante 8 días (Cuadro II). Para hacer evidente que los animales desarrollaron nefrotoxicidad se midieron los siguientes parámetros: a) proteinuria, b) creatinina plasmática y depuración de creatinina, y c) nitrógeno de urca (BUN). No se obtuvieron resultados que evidenciaran que los animales desarrollaron nefrotoxicidad, ya que los datos obtenidos en las ratas tratadas con GM fueron similares a los obtenidos de las ratas controles.

VI.2. MODELO 2. Posteriormente, se decidió inyectar 50 mg de GM/Kg/12 h de GM durante 8 días porque al revisar más literatura se encontró que hay mayor probabilidad de inducir nefrotoxicidad al dividir la dosis original en dos, aplicandolas cada 12 h (45) y porque vimos que algunos autores inyectaban dos veces al día. (Cuadro II). Las ratas se sacrificaron el día 9, 12 h después de la última inyección de GM. La orina se recolectó los días 3, 5, 7 y 9 y se realizaron las mismas mediciones que en el modelo anterior.

Los resultados indicaron que si había daño renal: el volumen urinario y la proteinuria aumentaron significativamente en el grupo tratado con GM desde el día 7 (Figura 5), la creatinina plasmática aumentó aproximadamente un 100%, la depuración de creatinina disminuyó un 50%, y el nitrógeno de urea incrementó 400% en el grupo tratado con GM (Tabla 1).

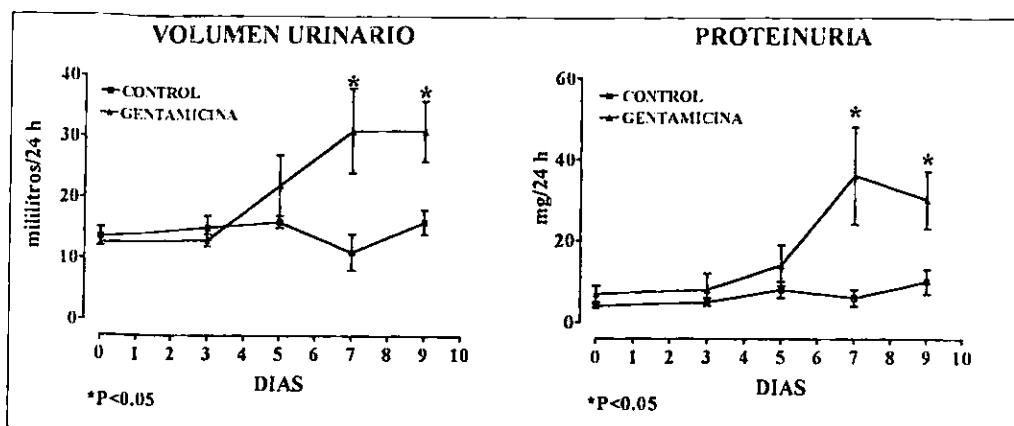


Figura 5 Comportamiento del volumen urinario y de la excreción de las proteínas totales de ratas del modelo 2 (50 mg/Kg/12 h durante 8 días) n = 8.

Tabla 1. Función renal en el día 9 en ratas tratadas con GM del modelo 2 (50 mg/Kg/12 h por 8 días). n = 8

Grupo experimental	Creatinina plasmática (mg/dL)	Depuración de creatinina (ml/min)	BUN en plasma (mg/dL)
Control	0.6 ± 0.1	1.4 ± 0.4	23 ± 5
Gentamicina	1.4 ± 0.4*	0.6 ± 0.1*	96 ± 23*

* P<0.05

Todos estos datos nos indicaban que la gentamicina había provocado nefrotoxicidad en las ratas. Sin embargo, consideramos que no eran tan evidentes como en los reportes de algunos autores. Por lo cual, realizamos un tercer experimento.

VI.3. MODELO 3. Este se realizó en 8 ratas con una dosis de 75 mg de GM/Kg/12 h durante 8 días y en 8 ratas controles. En este modelo, además de la proteinuria, la creatinina plasmática, la depuración de creatinina y el BUN, se midió la actividad de las enzimas N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en orina, y de la pGSH en plasma, y de CAT y cGSH-Px en homogenado renal. También se midió uno de los productos de liperoxidación (el malondialdehído) por el método del ácido tiobarbitúrico como un marcador de estrés oxidativo en orina durante el tratamiento, en plasma y en homogenizados de riñón obtenidos el día del sacrificio.

VI.3.A. Función renal para el modelo 3.

El volumen urinario y la proteinuria llegaron a un pico máximo en el día 7 y en el día 9 disminuyeron claramente (Figura 6). La proteinuria llegó a una concentración de 60 mg/24 h en el día 7. La actividad urinaria de NAG, al igual que la proteinuria, alcanzó un pico máximo el día 7 (Figura 7). Como ya se había mencionado, la NAG es una enzima que se encuentra en los lisosomas de las células del túbulo proximal, por lo tanto, el incremento en la excreción de esta enzima indica que hay daño (necrosis) en estas células.

En este experimento la creatinina plasmática aumentó 5 veces, la depuración de creatinina disminuyó 90% y el BUN aumentó aproximadamente 7 veces (Tabla 2).

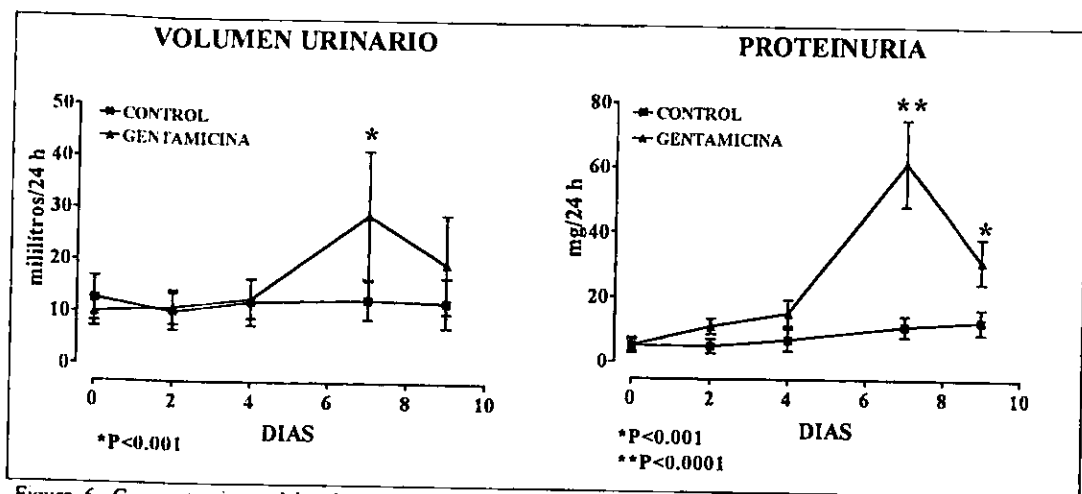


Figura 6 Comportamiento del volumen urinario y de la proteinuria durante el tratamiento con GM en el modelo 3 (75 mg/Kg/12 h durante 8 días) n = 8.

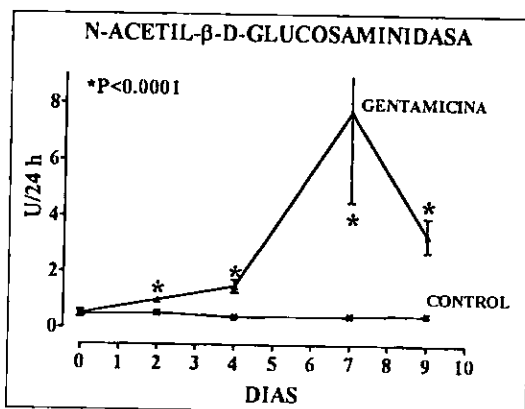


Figura 7. Comportamiento de la enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en el modelo 3 (75 mg/Kg/12h durante 8 días) n=8.

Tabla 2. Función renal en el día 9 en el modelo 3 (75 mg/Kg/12 h por 8 días)

Grupo experimental	Creatinina plasmática (mg/dl)	Depuración de creatinina (ml/min)	BUN en plasma (mg/dL)
Control	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.6	23 ± 4
Gentamicina	3 ± 1*	0.17 ± 0.1*	170 ± 27*

*P<0.001 n = 8.

VI.3.B. Marcadores de estrés oxidativo para el modelo 3.

Los resultados de la lipoperoxidación no fueron diferentes entre las muestras controles y las de GM (tabla 3), además no se parecían a los resultados reportados en la literatura (47,49,50,73), por lo que se decidió utilizar posteriormente un estuche comercial.

Tabla 3. Lipoperoxidación en orina, en homogenizados de riñón y en plasma en el modelo 3 (75 mg/Kg/12h durante 8 días).

Grupo experimental	ORINA (nmol MDA/24 h)	RIÑÓN (nmol MDA/mg proteína)	PLASMA (nmol MDA/ml)
Control	121 ± 24	0.39 ± 0.19	2.6 ± 1.3
Gentamicina	80 ± 48	0.39 ± 0.22	2.6 ± 1.2

n=8.

VI.3.C. Actividades de las enzimas antioxidantes para el modelo 3.

La actividad de pGSH-Px en plasma disminuyó aproximadamente un 70% (Figura 8). La actividad de cGSH-Px de homogenizado de riñón no cambió significativamente (Figura 8) aunque se observó una tendencia a disminuir con gentamicina.

La actividad de CAT disminuyó aproximadamente un 65% (Figura 9).

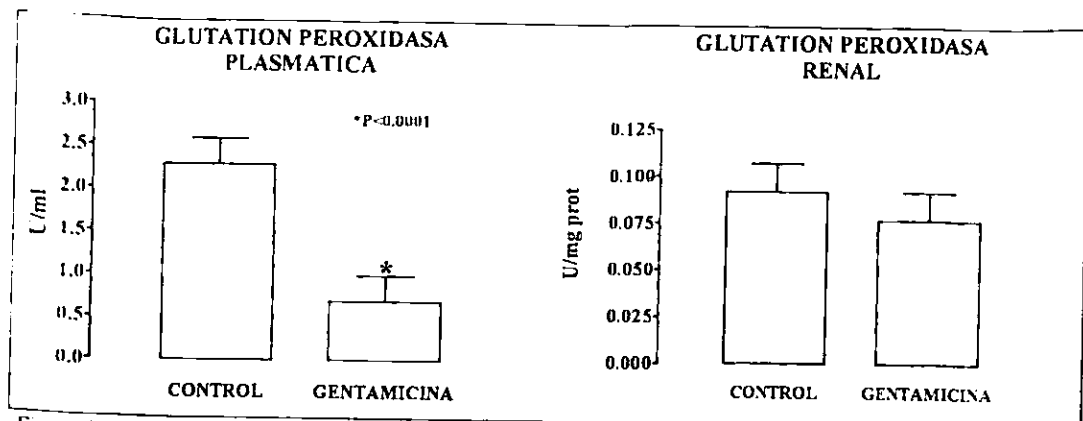


Figura 8. Actividad de las isomorfias extracelular y citosólica de GSH-Px para el modelo 3 (75 mg/Kg/12 h). n = 8

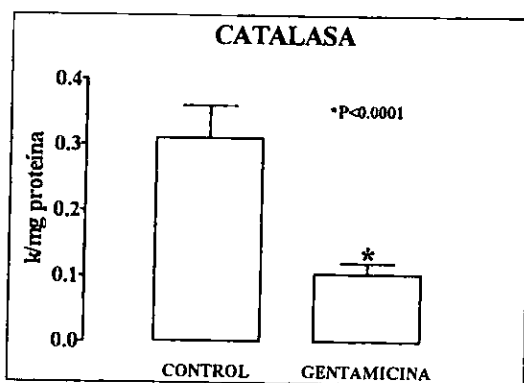


Figura 9. Actividad de CAT para el modelo 3 (75 mg/Kg/12 h durante 8 días). n = 8.

En base a los resultados obtenidos se realizó otro experimento en el que se sacrificaron los animales el día 7 donde se presenta el pico máximo de daño en base a volumen urinario, proteinuria y NAG. Esto con la finalidad de observar el comportamiento de las enzimas antioxidantes a este nivel de daño. Además se separaron la corteza y la médula para observar si había una regulación diferencial. Lo que nos llevó al siguiente modelo (modelo 4)

VI.4. MODELO 4. Con los experimentos realizados anteriormente se determinaron las condiciones para inducir la nefrotoxicidad y se procedió a estudiar el efecto protector del ajo. En este modelo se estudiaron 4 grupos con 8 ratas cada uno: control (CT), gentamicina (GM) (75 mg/Kg/12 h durante 6 días), control alimentado con ajo (A) y gentamicina alimentado con ajo (GM+A). El sacrificio fue el día 7. Aunado a los parámetros mencionados anteriormente, se calculó el cociente creatinina orina/creatinina plasma (UCr/PCr), y

se determinó el sodio urinario y plasmático, con lo cual se pudo calcular la fracción excretada de sodio. También se extrajeron los riñones de cada rata y se separaron la corteza y la médula. La actividad, la cantidad y los niveles de ARNm de CAT se midieron en médula y corteza renal y la actividad de cGSH-Px se midió también en médula y corteza, la actividad de pGSH-Px se midió en plasma. Paralelamente, se midió lipoperoxidación en homogenados de corteza del día del sacrificio con un estuche comercial. Además, se realizaron los estudios de histología renal y concentración de gentamicina en riñón.

VI.4.A. Función renal para el modelo 4.

El volumen urinario aumentó significativamente en el día 7 en los grupos GM y GM+A (Figura 10)

La proteinuria aumentó significativamente en los grupos tratados con GM desde el día 5 del tratamiento. En el grupo GM se observó el día 7 un valor aproximado de 50 mg de proteína en 24 horas y de 35 mg para el grupo GM+A (Figura 10).

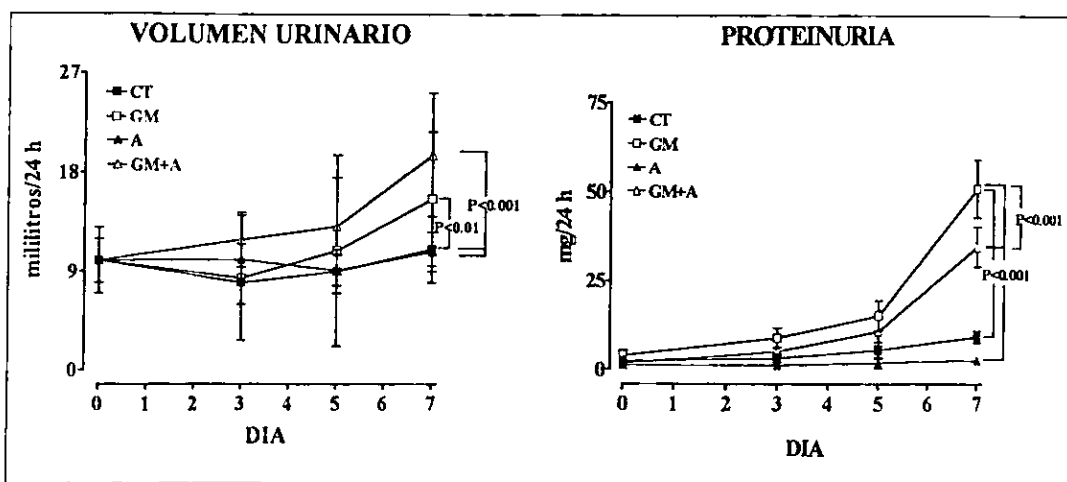


Figura 10. Volumen urinario y proteinuria para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina (n=8).

La excreción urinaria de la enzima NAG tuvo el mismo comportamiento que la proteinuria, alcanzando en el día 7 un valor de 4.5 U/24 h en el grupo GM y 2.0 U/24 h en el grupo GM+A (Figura 11). Estos resultados junto con los del volumen urinario y los de la proteinuria indican que el ajo previno parcialmente el daño renal.

Los niveles de nitrógeno de urea en plasma se muestran en la figura 12. La GM aumentó los niveles de nitrógeno más del 200%, pero el ajo impidió que los niveles fueran tan altos, ya que incrementaron sólo aproximadamente en un 100%.

Los resultados de la creatinina plasmática fueron similares a los del nitrógeno de urea (Figura 13A). La GM incrementó los niveles y el ajo previno parcialmente el daño renal. En cuanto a la depuración de creatinina, en el grupo GM disminuyó aproximadamente un 50% en comparación con el grupo control y el ajo previno la disminución de la depuración causada por la GM (Figura 13B).

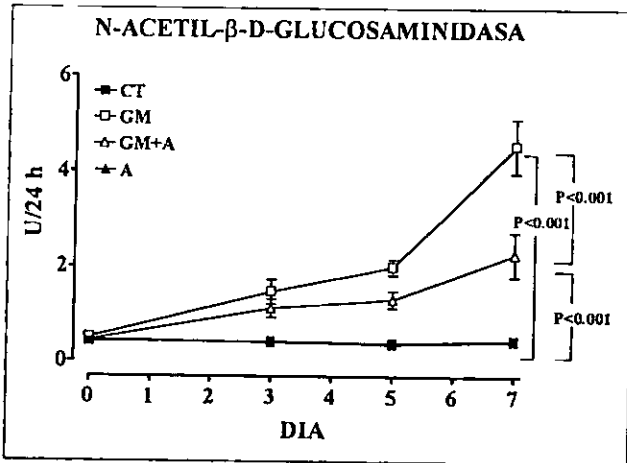


Figura 11. Excreción urinaria de la enzima NAG para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. n=8.

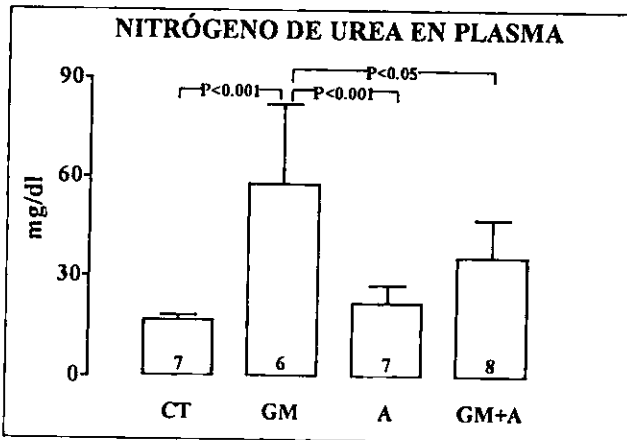


Figura 12. Concentración de nitrógeno de urea en plasma en el día 7 para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

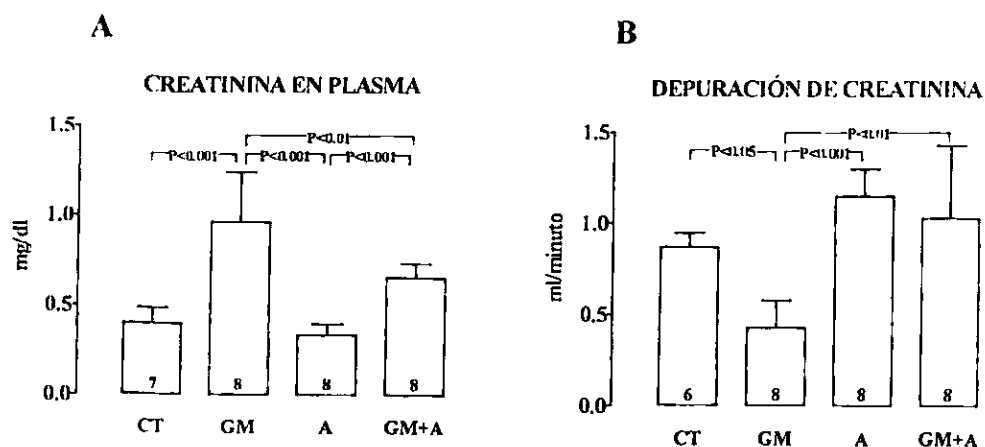


Figura 13. (A) Creatinina en plasma y (B) depuración de creatinina en el día 7 para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

Por otro lado, también podemos observar que la reabsorción tubular de agua disminuyó más del 60% en los grupos tratados con GM (Figura 14A) pero el ajo no previno este cambio. No hubo cambios significativos en la fracción excretada de sodio entre los 4 grupos (Figura 14B)

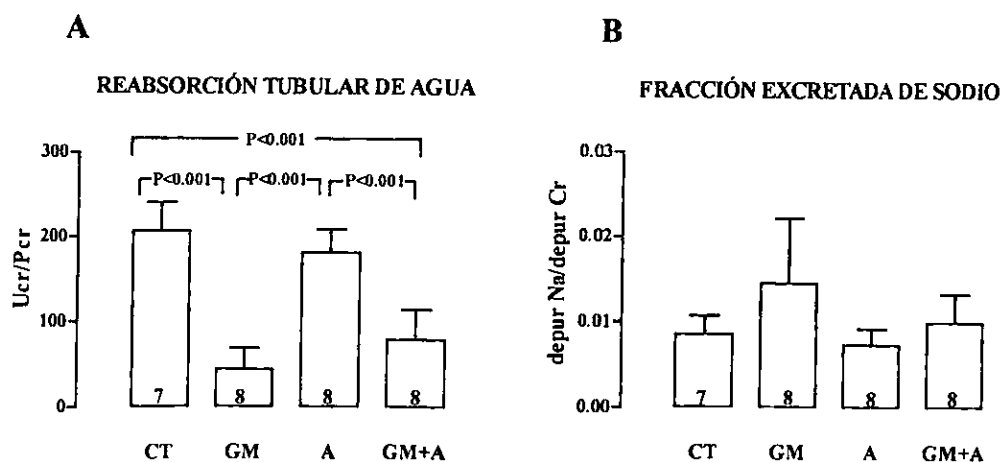


Figura 14. (A) Reabsorción tubular de agua y (B) Fracción excretada de sodio para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

VI.4.B. Marcador de estrés oxidativo para el modelo 4.

Para determinar la lipoperoxidación se utilizó un estuche comercial, encontrando diferencias significativas entre los cuatro grupos. Como podemos observar en la figura 15, la lipoperoxidación aumentó aproximadamente 3 veces en el grupo tratado con GM en comparación con el grupo control. Esto corrobora que las ERO sí intervienen en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. También podemos observar que el ajo previno el aumento en la lipoperoxidación que causa la GM, ya que el grupo GM+A tuvo valores similares a los del grupo control.

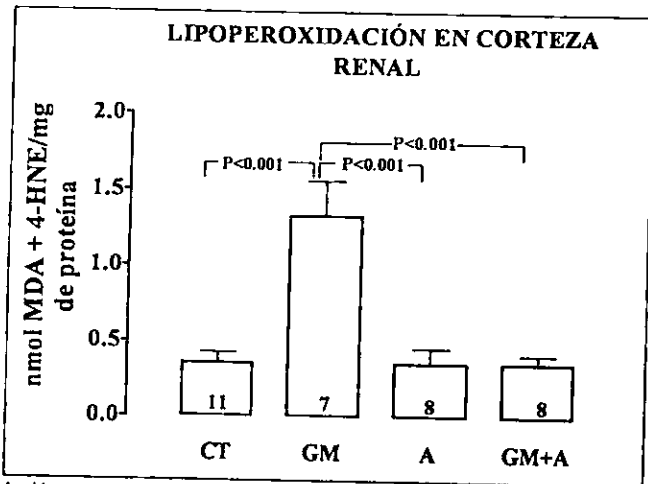


Figura 15. Lipoperoxidación en corteza renal para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

VI.4.C. Actividad de las enzimas antioxidantes GSH-Px para el modelo 4.

En cuanto a la actividad de cGSH-Px en corteza, podemos ver en la figura 16A que la GM disminuyó la actividad de esta enzima en comparación con el grupo control, y que el ajo evitó esta disminución ya que la actividad en el grupo GM+A es igual al grupo C. Sin embargo, en médula no se observaron cambios (figura 16B). Por otro lado, la actividad de pGSH-Px también disminuyó por la GM, y el ajo tuvo un efecto parcialmente protector, ya que se observó que en el grupo GM+A la disminución fue menor (figura 16C).

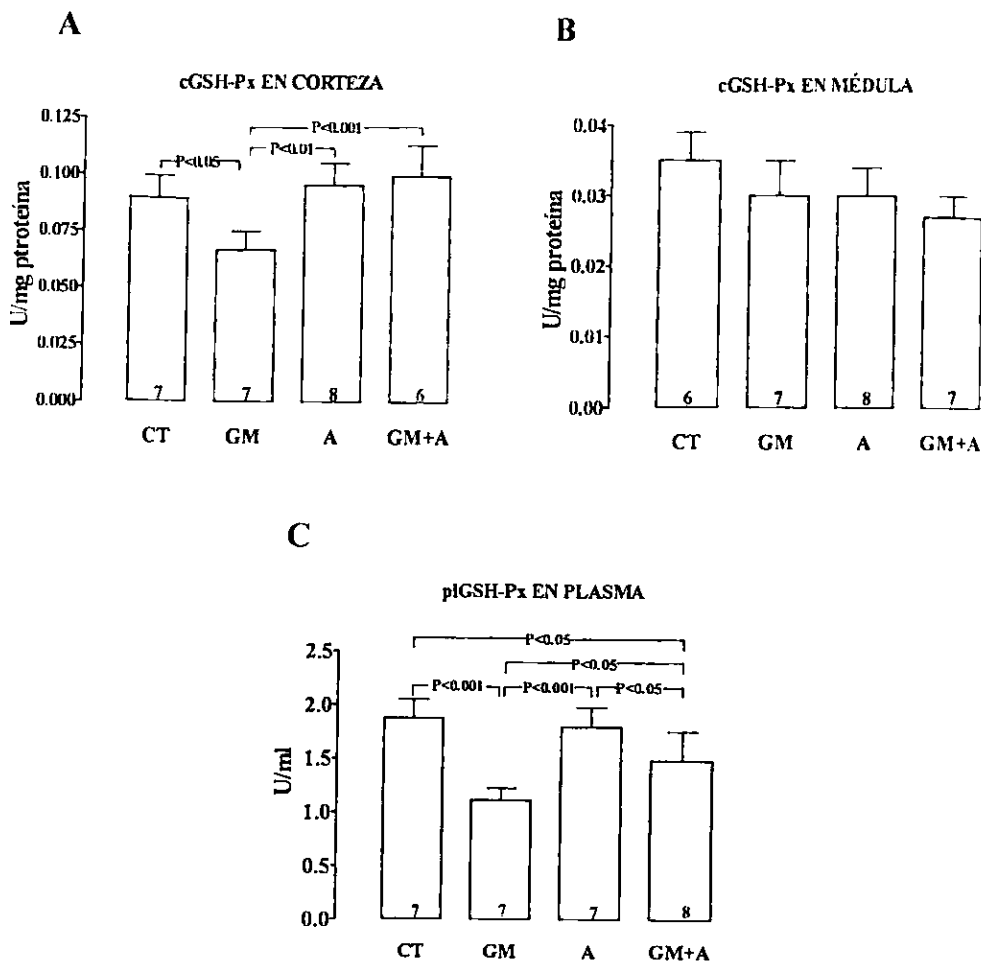


Figura 16. Actividad de las isomorfias de GSH-Px. cGSH-Px en corteza (A), cGSH-Px en médula (B) y plGSH-Px en plasma (C) en el día 7 para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras

VI.4.D. Expresión de la enzima CAT para el modelo 4.

La actividad enzimática de CAT en corteza (Figura 17A) disminuyó en los grupos GM, A y GM+A en aproximadamente un 50% en comparación con el grupo control. Esta disminución se debió a que la cantidad de esta enzima, medida por Western blot, también disminuyó en estos mismos grupos como podemos verlo en la figura 17B. Por otro lado, en la figura 17C se muestra que los niveles de ARNm de la enzima CAT en corteza renal, solo disminuyeron en el grupo GM. Lo anterior significa que la cantidad de CAT disminuyó, en parte.

como consecuencia de la disminución de los niveles de ARNm de esta enzima en el grupo GM. Sin embargo el ajo previno esta disminución, por lo que la disminución de la concentración de la proteína en los grupos A y GM+A muy probablemente se debe a eventos pos-transcripcionales.

CATALASA EN CORTEZA RENAL

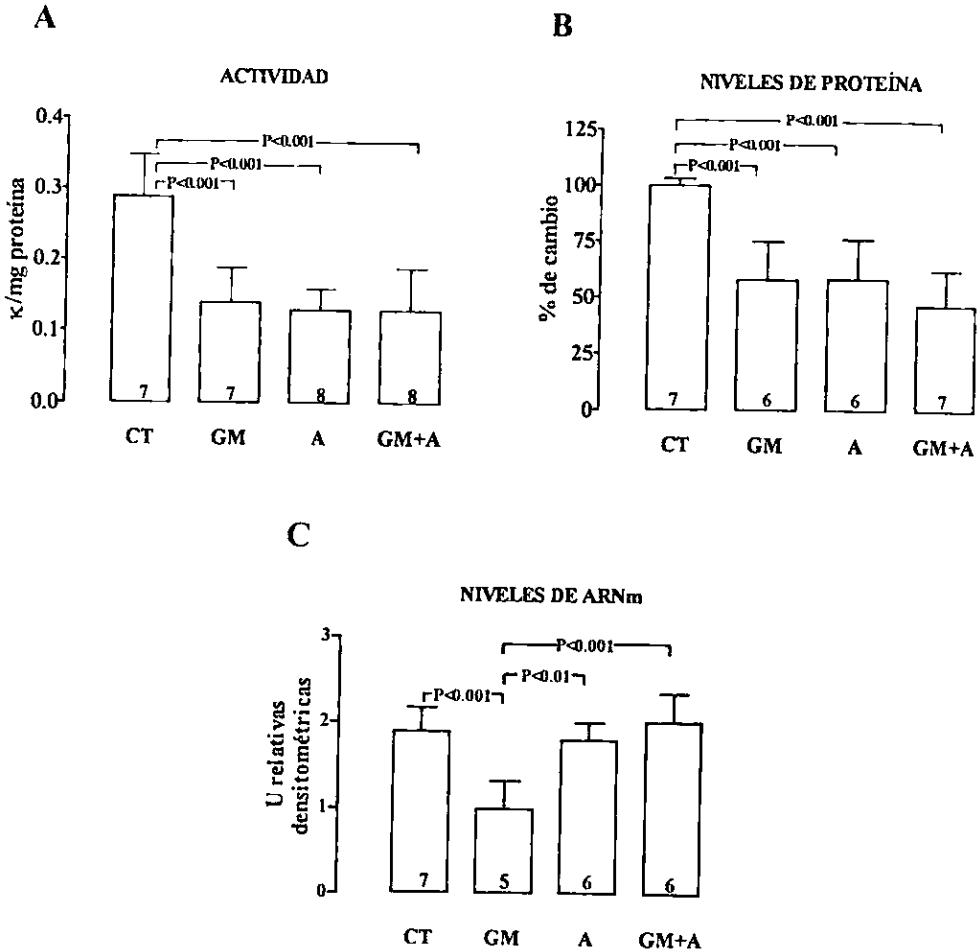


Figura 17. Actividad (A), niveles de proteína (B) y niveles de ARNm (C) de la enzima CAT en corteza renal para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

En médula la actividad de la enzima CAT disminuyó en los grupos GM, A y GM+A (figura 18A), lo que puede deberse a que la cantidad de proteína analizada por Western blot disminuyó en estos mismos grupos

(figura 18B). Sin embargo los niveles del ARNm de CAT en médula renal no se modificaron en ninguno de los grupos (figura 18C), por lo que se puede decir que la disminución de la cantidad de CAT en médula en el grupo GM no se debe a la disminución del ARNm de esta enzima

CATALASA EN MÉDULA RENAL

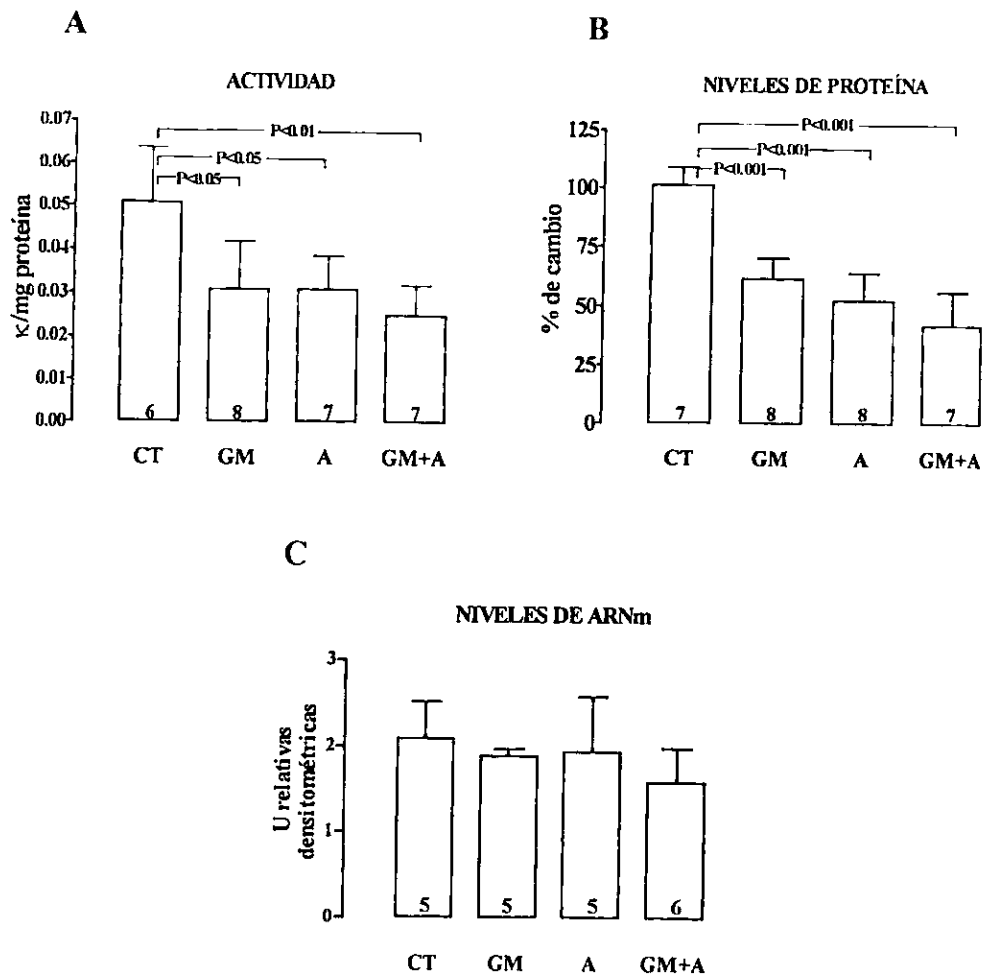


Figura 18. Actividad (A), niveles de proteína (B) y niveles de ARNm (C) de la enzima CAT en médula renal para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo. GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

Con estos resultados podemos ver que la GM disminuye la cantidad de proteína y la actividad de la enzima CAT, tanto en corteza como en médula renal, pero también podemos observar que el ajo por si solo disminuye la cantidad de proteína y la actividad de esta enzima tanto en corteza como en médula

VI.4.E. Contenido de gentamicina en corteza renal para el modelo 4.

En la figura 19 se muestra que el ajo no alteró el contenido de gentamicina en la corteza renal, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos GM y GM+A que tuvieron valores de 3.73 ± 0.32 y 4.5 ± 0.7 , respectivamente

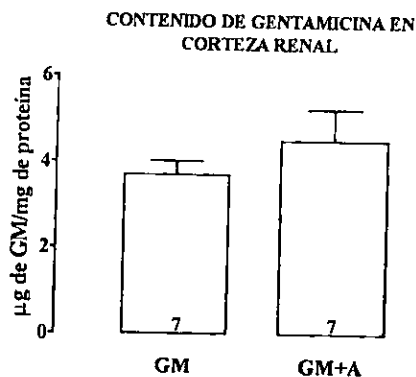


Figura 19. Contenido de gentamicina en corteza renal para el modelo 4. CT = grupo control, GM = grupo tratado con gentamicina, A = grupo alimentado con ajo, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

VI.4.F. Daño histológico.

En la figura 20 se observa que el grupo tratado con GM muestra inflamación, vacuolización y necrosis en las células epiteliales del túbulo proximal (figura 20B), comparadas con el grupo control (figura 20A), donde no se observan estas alteraciones histológicas. En el grupo GM+A el daño tubular inducido por GM disminuyó significativamente (figura 20C). No se observaron alteraciones histológicas en los túbulos proximales de las ratas alimentadas con ajo (datos no mostrados). Al hacer el análisis cuantitativo, se encontró que el porcentaje de área tubular dañada es menor en el grupo GM+A (33.5 ± 14) que en el grupo GM (78.2 ± 11.3) (figura 21) haciéndose evidente el daño histológico inducido por la GM y el efecto protector del ajo.

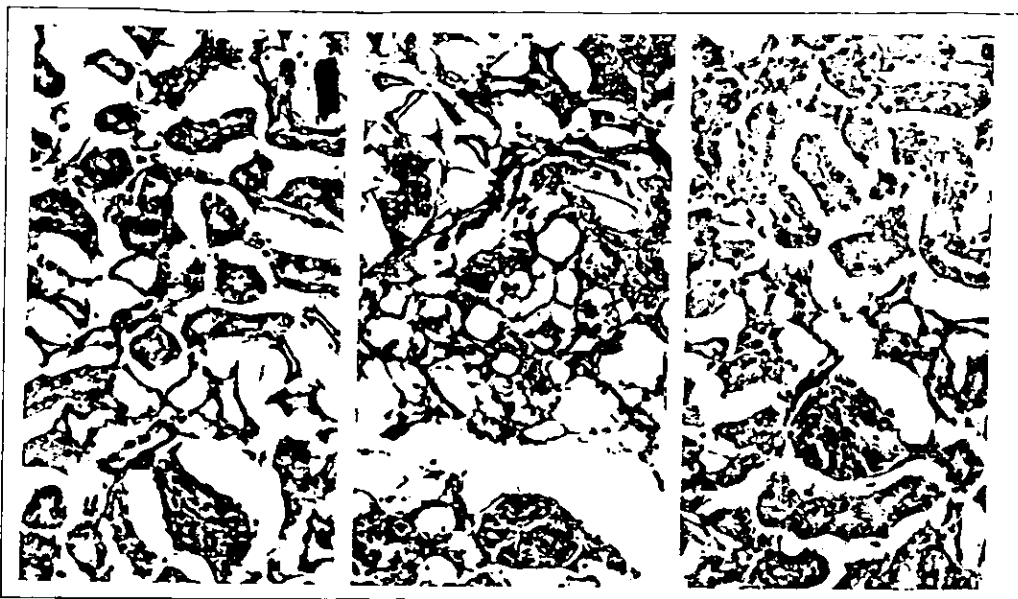


Figura 20. Microscopía de luz de los cortes de corteza renal de (A) ratas controles, (B) ratas tratadas con GM para el modelo 4, las cuales muestran necrosis (flechas) y descamación de las células epiteliales del túbulo proximal (cabeza de flecha) y (C) ratas tratadas con GM+A, en las cuales es evidente un menor daño histológico que el observado en las ratas tratadas con GM. H&E. (A) y(B) 100X; (C) 200X

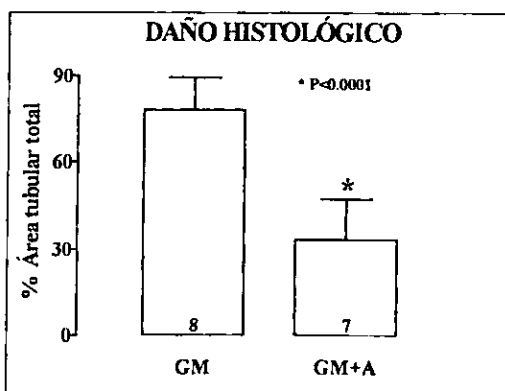


Figura 21 Daño histológico presentado en la nefrotoxicidad inducida por GM para el modelo 4 GM = grupo tratado con gentamicina, GM+A = grupo alimentado con ajo y tratado con gentamicina. La n de cada grupo se muestra dentro de las barras.

VII. RESUMEN DE RESULTADOS

La GM provocó alteraciones a nivel tubular (aumento de la excreción urinaria de proteínas y de NAG y daño histológico) y glomerular (aumento de creatinina y nitrógeno de urea en plasma, y disminución en la depuración de creatinina). También provocó un aumento en la lipoperoxidación.

El ajo disminuyó el daño tubular, glomerular y la lipoperoxidación causada por la GM, sin que disminuyera la concentración del antibiótico en la corteza renal.

La actividad de la enzima cGSH-Px en corteza renal disminuyó en el grupo GM, y el ajo previno esta disminución.

La actividad de la pGSH-Px disminuyó en el grupo tratado con GM y el ajo previno parcialmente esta disminución.

La GM disminuyó la actividad, la cantidad y los niveles de ARNm de CAT en corteza renal.

Los grupos A y GM+A tienen el mismo comportamiento, la actividad y la cantidad de CAT disminuyeron en corteza renal, pero los niveles de ARNm no cambiaron.

En cuanto a las mediciones realizadas en médula, se observó que los grupos GM, A y GM+A tuvieron el mismo comportamiento, la actividad y la cantidad de CAT disminuyó, pero no los niveles de ARNm.

VIII. DISCUSION

VIII.1. MARCADOR DE ESTRES OXIDATIVO

Los fosfolípidos de membrana contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados muy vulnerables a la peroxidación. A este fenómeno se le denomina lipoperoxidación, el cual indica la presencia y participación de las ERO (73). En el modelo 4 medimos los niveles de MDA y 4-hidroxinonenal, productos de la lipoperoxidación, y encontramos que estos aumentan significativamente en la corteza renal de ratas tratadas con GM, lo cual concuerda con otros trabajos (47,49,50,73), confirmando así que las ERO están involucradas en la nefrotoxicidad inducida por la GM.

Debido a que en el grupo GM+A no hubo aumento en la lipoperoxidación y el daño histológico fue mucho menor en comparación con el grupo GM, el efecto protector del ajo puede deberse a sus propiedades antioxidantes y a que previno la disminución de la actividad de la enzima cGSH-Px en corteza y la pGSH-Px en plasma.

VIII.2. DISFUNCIÓN TUBULAR

Para evaluar la función tubular se evaluó el daño histológico, la excreción urinaria de proteínas y de NAG, la actividad de la enzima pGSH-Px, la reabsorción tubular de agua y la fracción excretada de sodio.

Al evaluar el daño histológico se encontró que hubo necrosis celular de los túbulos proximales en el grupo GM. Esta necrosis celular explica, al menos en parte: a) el aumento en la excreción urinaria de proteínas, ya que las proteínas (de bajo peso molecular) son reabsorbidas en las células de los túbulos proximales y posiblemente también porque se excretan todas las proteínas de las células necrosadas, b) el aumento en la excreción urinaria de la enzima NAG, porque esta enzima se localiza en los lisosomas de los túbulos proximales, c) la disminución de la actividad de pGSH-Px, ya que es una enzima que se sintetiza en los túbulos proximales (24) y que se secreta a la sangre, por lo tanto, la GM al dañar las células tubulares, conduce probablemente a una disminución en la síntesis de esta enzima y consecuentemente a una disminución de su actividad en plasma, y d) la disminución en la reabsorción tubular de agua, ya que en el túbulo proximal se reabsorbe agua y si las células de los túbulos están dañadas por la GM, entonces se altera la reabsorción del agua. Por otro lado, uno esperaría que la fracción excretada de sodio se hubiera visto afectada por la necrosis, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos.

El ajo tuvo un efecto parcialmente protector por que previno que los valores de la proteinuria y los de la excreción urinaria de NAG en el grupo GM+A fueran tan altos como los del grupo GM. El ajo también produjo que el daño histológico fuera menor que en el grupo GM+A en comparación con el grupo GM y previno que la actividad de pGSH-Px disminuyera en el grupo GM+A en menor proporción que en el grupo GM. Por lo tanto, el ajo disminuyó algunas alteraciones tubulares inducidas por la GM.

VIII.3. DISFUNCIÓN GLOMERULAR

En este trabajo se encontraron incrementados los niveles de creatinina y nitrógeno de urea en plasma, así como una disminución en la depuración de creatinina en las ratas tratadas con GM.

Estas alteraciones en el grupo GM pueden deberse a la producción exagerada de ERO, apoyado esto con el incremento en la lipoperoxidación y en que se conoce que las ERO pueden disminuir la velocidad de filtración glomerular (GFR). Se ha demostrado que tanto las ERO, en particular el H_2O_2 (118), como la GM (119) tienen efectos contráctiles sobre células mesangiales cultivadas de rata, lo cual modifica la superficie de filtración y consecuentemente el coeficiente de ultrafiltración capilar glomerular (K_f), lo que conduce a una disminución en el GFR. Además, la GM disminuye la actividad de la enzima Mn-SOD (120), por lo tanto aumenta la concentración del anión superóxido, el cual a su vez puede inactivar al óxido nítrico que es un vasodilatador, lo que conduciría a una disminución de la GFR, ya que se ha visto que las ratas tratadas con GM más N^G -nitro-L-arginina metil ester (un inhibidor de la producción de óxido nítrico) presentan mayor deterioro de la función renal que el observado en ratas tratadas únicamente con GM (121). Por otro lado, se ha reportado que la GM estimula la síntesis del óxido nítrico en las células mesangiales de rata (122,123), lo que nos indica que posiblemente el óxido nítrico es sintetizado para proteger al riñón de los efectos de la GM.

Las ERO pueden estar actuando por una vía indirecta. Se ha demostrado que el H_2O_2 (118) y la GM (119) estimulan la síntesis y liberación del factor activador de plaquetas (PAF) en cultivos de células mesangiales de rata. El PAF es un lípido con efectos vasoactivos sobre el riñón, el cual causa una disminución total en la filtración glomerular y el flujo renal, debido a la vasoconstricción arterial del riñón y/o a un efecto sobre la contracción de células mesangiales (124-126). Se ha visto que al tratar ratas con GM y BN 52021 (un antagonista de PAF), se previene parcialmente la disminución en la filtración glomerular por nefrona (124). También se ha observado que el K_f regresa a sus niveles normales en animales tratados con captopril (un inhibidor de la enzima que convierte a la angiotensina I a la II) más GM (124). La angiotensina II estimula la producción de PAF en cultivos de células mesangiales de rata (127). Así, el efecto protector de captopril sobre el K_f , puede ser mediado por la disminución de la producción de PAF. Entonces la participación de la angiotensina II sería otro mecanismo por el cual la GM está induciendo IRA.

Estos tres parámetros concuerdan con los reportados por algunos autores (49,50), aunque la magnitud de estos cambios son diferentes en cada trabajo. Estas diferencias pueden deberse a varios factores, así como la especie de animal usado, el sexo, la duración del tratamiento, la dieta, la dosis y la vía de administración de la droga, etc.

El ajo además de disminuir las alteraciones tubulares, también disminuye las alteraciones glomerulares, probablemente debido a sus propiedades antioxidantes y a la capacidad de prevenir la disminución de la

actividad de Mn-SOD (120) y de cGSH-Px en corteza, lo que probablemente evitaría el aumento en las ERO y por lo tanto su efecto sobre el GFR.

VIII.4. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE cGSH-Px

En cuanto al comportamiento de las actividades de la cGSH-Px en corteza renal y la pGSH-Px en ratas tratadas con GM no había información en la literatura, excepto un trabajo donde utilizaron cobayos, donde se encontró que la cGSH-Px de tejido de riñón disminuía de 0.117 ± 0.014 a 0.046 ± 0.017 U/mg de proteína (37).

En el presente trabajo se encontró que la actividad de la cGSH-Px en corteza renal disminuyó en el grupo GM. Esto puede deberse a una producción exagerada de el anión superóxido, ya que hay un aumento en la lipoperoxidación, una disminución en la actividad de la Mn-SOD (120) y que se sabe que el anión superóxido inhibe las actividades de las enzimas CAT y cGSH-Px (128-130).

Otra explicación es que la concentración de selenio (Se) pudiera estar disminuida y sería la razón por la cual la actividad de la enzima cGSH-Px de corteza se vea alterada en este trabajo. Ngaha *et al.* (131), han observado que el Se, el cofactor de GSH-Px disminuye la nefrotoxicidad por GM en ratas. Además, se ha demostrado que la expresión del ARNm de esta enzima disminuye en hígado de rata deficientes en Se (132). Aunque nosotros no hemos medido la concentración de Se, esta pudiera ser una posibilidad.

Por otra parte, la actividad de la cGSH-Px en corteza no disminuyó en el grupo GM+A, lo cual indica que el ajo previno la disminución de la actividad de esta enzima inducida por la GM, debido a sus propiedades antioxidantes (120,133,134).

VIII.5. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE CAT

En otros modelos donde se relacionan el estrés oxidativo y la regulación de la CAT, se ha encontrado que la respuesta de la CAT al estrés oxidativo es impredecible. Hay evidencias de que la actividad y/o expresión génica de la CAT disminuye (135-137), no cambia (138) o se incrementa (40,139,140) durante el estrés oxidativo. Por ejemplo, Gwinner *et al.* en 1997 (141) encontraron en el modelo de síndrome nefrótico por aminonucleósido de puromicina que los niveles de la CAT renal (medido por Western blot) disminuyen, pero los niveles de ARNm no cambian. Estos autores sugirieron que la disminución de la actividad de la CAT es consecuencia de la baja cantidad de enzima, lo que puede estar contribuyendo al daño por las ERO en la nefrotoxicidad por aminonucleósido de puromicina. Además, se ha encontrado que la expresión de la CAT puede regularse a varios niveles: transcripción del gen (139), estabilidad del ARNm (140), degradación de la CAT (142) y eficiencia de la traducción (143).

En este modelo hubo una disminución en la actividad, en la cantidad de proteína y en los niveles del ARNm de CAT en corteza de ratas tratadas con GM. Esto quiere decir que el efecto de la GM sobre es, al menos en

parte, a nivel transcripcional y la baja actividad de CAT, lo que puede causar que células y tejidos estén más expuestos al ataque peroxidativo y daño por radicales libres

También se observó que el ajo *per se* disminuye la actividad renal y la cantidad de CAT, pero no los niveles del ARNm, y lo mismo sucedió en el grupo GM+A. Algo similar encontraron Chen y su grupo (144), quienes observaron que la actividad y la cantidad de CAT disminuye en el hígado de ratas y ratones tratados con homogeneizados de ajo fresco (de 2 o 4g de ajo fresco en agua bidestilada/Kg de peso/7 días) y con dialil sulfuro (DAS, un componente del ajo, 50 o 200mg/Kg de peso/8 o 29 días), y que estos mismos tratamientos no causaron cambios en las actividades de las enzimas SOD y GSH-Px en el mismo tejido. Sin embargo, ellos no encontraron una explicación por la cual el ajo o DAS estuvieran afectando solo a la CAT.

En otro trabajo (145) se encontró que en los animales alimentados con ajo en polvo (2%), la síntesis renal de CAT disminuyó y su degradación no cambió. Entonces la reducción en la actividad y en el contenido de CAT es secundaria, probablemente, a la disminución en la síntesis. La disminución en la síntesis, en presencia de una invariable degradación y un estado estable de los niveles de ARNm de CAT, sugiere una disminución en la eficiencia traduccional de los ARNm, lo cual es un evento post-transcripcional. Interesantemente, se ha encontrado que el ajo o algunos de sus compuestos como la S-alil-cisteína, la S-alil mercaptocisteína y la alina son capaces de disminuir la concentración de H_2O_2 *in vitro* (133,146) e *in vivo* (92), por lo cual se puede especular que si hay bajos niveles de peróxido de hidrógeno, no es necesaria la síntesis de CAT ya que sería un gasto energético innecesario para la célula, lo cual conduce a una disminución en la actividad de esta enzima.

Esta disminución en la expresión renal de CAT pudiera ser considerada como una desventaja, sin embargo, esto no se reflejó como daño renal (aumento de lipoperoxidación, de nitrógeno de urea, de la excreción urinaria de proteínas, etc., en las ratas alimentadas con ajo). Y esto puede estar asociado con que la dieta con ajo no modifica las actividades de otras enzimas antioxidantes como la cGSH-Px en corteza y médula, la pIGSH-Px, estudiadas en este trabajo y la EC-SOD, Mn-SOD y CuZn-SOD (120). Esto sugiere que hay una regulación diferencial en la expresión de las enzimas antioxidantes en ratas alimentadas con ajo.

Se considera que la GSH-Px juega un papel mucho más importante que CAT, porque se ha reportado que la peroxidación en el corazón de rata es incrementada solo por la restricción de selenio, un componente clave para la actividad de GSH-Px, pero no por ATZ, un fuerte inhibidor de CAT (147), y se ha observado que la inducción de la producción de H_2O_2 en hepatocitos de rata por etilmorfina ocurre solo cuando GSH-Px es inhibida, pero no por la inhibición de la CAT (148). Por lo tanto, en este trabajo la disminución de la expresión de CAT por la alimentación con ajo no está causando daño renal a las ratas, probablemente porque las actividades de cGSH-Px y pIGSH-Px no son afectadas por la dieta con ajo.

Finalmente, se observó que el efecto protector del ajo, no se basó en que éste hubiera disminuido la concentración de la GM en la corteza renal, lo que indica que fueron sus propiedades antioxidantes las que protegieron.

IX. CONCLUSIONES

- 1.- La GM alteró la expresión renal de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa
- 2.- La dieta con ajo disminuyó la nefrotoxicidad inducida por el antibiótico. El ajo previno las alteraciones tubulares y glomerulares posiblemente por sus propiedades antioxidantes, ya que previno el incremento en la liperoxidación y la disminución de la actividad de cGSH-Px en corteza renal.

X. APÉNDICES

APÉNDICE 1

Condiciones para la RT-PCR para la síntesis de la sonda de CAT.

La transcripción reversa fue realizada usando el GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, USA) con la siguiente mezcla: 2 μ l del amortiguador transcriptasa reversa 5X, 2 μ l de los dNTPs (2mM cada uno), 1 μ l de oligo-dT (0.1 mg/ml), 1.75 μ l de agua con DEPC, 1 μ l de inhibidor de RNasa (10 U/ml), 0.25 μ l transcriptasa reversa M-MuLV (200 U/ μ l), y 2 μ l de ARN total ultrapurificado. Los ciclos fueron los siguientes: 1 h a 42°C, 5 min a 94°C y 10 min a 4°C. La PCR se realizó añadiendo 5 μ l de amortiguador para PCR (10X), 5 μ l de la mezcla de dNTPs (2 mM cada uno), 24 μ l de agua con DEPC, 3 μ l de primer superior (10 mM), 3 μ l de primer inferior (10 mM) y 0.4 μ l de ADN Taq polimerasa; 1 ciclo: 5 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1.5 min a 72°C. 33 ciclos: 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1.5 min a 72°C; y 1 ciclo: 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 7 min a 72°C, 10 min a 4°C.

APÉNDICE 2

Extracción del ARNm total por el método de TRIzol.

Se homogeneizaron 0.1 g de tejido (corteza o médula renal) en 1 ml de TRIzol (Gibco BRL) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo, se agitó durante 15 seg. en vortex y se incubó de 2 a 3 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C. La fase acuosa (superior) se transfirió a otro tubo con cuidado de no tomar nada de la interface. Se le agregaron 0.5 ml de isopropanol, mezclando por inversión, se incubó durante 10 minutos a 4°C, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 10 min. a 4°C y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75 % en agua con DEPC por cada mililitro de TRIzol. Se agitó en el vortex, se centrifugó a 7500 r.p.m. durante 5 min. a 4°C y se le quitó todo el sobrenadante posible. La pastilla se resuspendió en agua con DEPC y se almacenó a -80°C.

Las pastillas resuspendidas se leyeron a 280 y 260 nm para obtener la concentración del RNA (260 nm) y un cociente de las lecturas obtenidas (260/280) y que es un indicador de la calidad del RNA. Un cociente de 1.7-2.0 indica que el RNA está en buenas condiciones. Las muestras se ajustaron a una concentración de 5 μ g/ μ l.

Soluciones utilizadas en la extracción de ARN y en el Northern blot.

Agua con DEPC: Dietilpirocarbonato (DEPC) disuelto en agua bidestilada para dar una concentración final

de 1 μ l/ml, dejar en agitación toda la noche y esterilizar en autoclave

Amortiguador A (Ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M)

Amortiguador B Mezclar 2 ml de reactivo de bloqueo al 10X (estuche comercial) por cada 8 ml de amortiguador A. Preparar al momento de usar.

Amortiguador C Mezclar 20 ml de Tris-base HCl 1M pH 9.5 con 4 ml de NaCl 5 M y 5 ml de MgCl₂ 1M. Aforar a 200 ml con agua bidestilada. Preparar al momento de usar.

Amortiguador MOPS 10X Mezclar 41.86 g de MOPS (ácido propanesulfónico 3-N-Morfolino), 6.8 g de acetato de sodio y 20 ml de EDTA 0.5 M en agua con DEPC, ajustar a pH 7.0 y aforar a 1000 ml con agua con DEPC. Esterilizar por filtración.

Amortiguador 20X SSC (NaCl 3 M; Na₃C₆H₅O₇·H₂O 300 mM).

Amortiguador 10% SDS (lauril sulfato de sodio). No esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente por no más de 1 mes.

Amortiguador de lavado 1 Mezclar 100 ml de 20X SSC y 10 ml de SDS 10%. Aforar a un litro con agua bidestilada estéril.

Amortiguador de lavado 2 Mezclar 2.5 ml de 20X SSC y 10 ml de SDS 10%. Aforar a un litro con agua bidestilada estéril.

Azul de bromofenol: Preparar una solución al 0.25% de azul de bromofenol y 0.25% de xilen-cianol en glicerol al 35%.

Bromuro de etidio 10 ng/ml Para prepararlo se usan guantes y cubre bocas.

APÉNDICE 3

Northern blot con el estuche comercial "Dig Hihg Prime DNA Labeling and Detection" Starter Kitt II

Para la hibridación, se colocó la membrana que contenía el ARN (10µg por muestra) en bolsas de plástico. Se le adicionaron 15 ml de solución de prehibridación (Dig easy hyb Boehringer) y se incubó durante 2 h a 50 °C. Simultáneamente, se mezclaron 5 µl de sonda marcada con 95 µl de solución de prehibridación, y se colocó a baño María en agua hirviendo durante 10 min para desnaturalizar la sonda, inmediatamente después se puso en baño de hielo. Esta mezcla se adicionó a la bolsa con la membrana y se incubó de 15 a 20 h a 42°C.

Para los lavados, se colocaron 100 ml de solución SSC 2X-SDS al 0.1% (apéndice 2) en un recipiente y se puso la membrana a lavar durante 15 min a temperatura ambiente con agitación. Este mismo procedimiento se repitió una vez más. Después, la membrana se lavó con 100 ml de solución SSC 0.5X-SDS al 0.1% (apéndice 2) y se incubó durante 15 min a 55°C.

Se colocó la membrana hibridada y lavada en un recipiente, se le adicionaron 100 ml de amortiguador A (apéndice 2) durante 1 min. La membrana se volvió a colocar en bolsa de hibridación y se le adicionaron 15 ml de amortiguador B (apéndice 2) y se dejó incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 1 µl del anticuerpo del estuche comercial por cada 10 ml de amortiguador B y se dejó incubar durante 30 min a 37°C. Se lavó 2 veces durante 15 min a temperatura ambiente con 100 ml amortiguador A. Se expuso

durante 2 min a temperatura ambiente al amortiguador C (100 ml). Después se escurrió el exceso a la membrana y se incubó con el sustrato del estuche comercial (CSPD) (aproximadamente 20 gotas por membrana) durante 30 min. a 37 °C. colocando la membrana entre dos acetatos, se quitó nuevamente el exceso, y se expuso a película de R-X durante 2 h y se reveló la autorradiografía.

APÉNDICE 4

Western blot

Se prepararon dos geles de poliacrilamida usando el gel de resolución al 12% y el gel concentrador al 5% en una cámara Hoefer Mighty Small™ SE 245 dual gel caster de Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA). Cuando los geles se habían polimerizado, se montaron en la cámara de electroforesis. En tubos eppendorf, se desnaturalizaron 6 µl del homogeneizado (con concentración de 5 µg/µl), con 6 µl de 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%) en agua hirviendo durante 7 min. El contenido de los tubos se colocó en cada uno de los pozos de los geles de poliacrilamida montados previamente. La electroforesis se corrió durante 1 h a 20 mA por cada gel. Ocasionalmente uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie durante 2 h para verificar que la cantidad de proteína colocada en los pozos haya sido similar. En seguida, las proteínas se transfirieron electroforéticamente durante 2 h a 400 mA a una membrana de nitrocelulosa "Hybond ECL" de Amersham Life Science (Inglaterra) con la ayuda de una cámara de transferencia. Para asegurar que la transferencia de proteínas fue completa, al final de ésta algunos geles se tiñieron con azul de Coomassie durante 2 h. y después se destiñó con una solución que contenía metanol-agua en una proporción 1:1 (45 ml + 45 ml) y 10 ml de ácido acético. La ausencia de bandas indicó que la transferencia fue completa.

Para el Western blot, las membranas se bloquearon con leche *velvety* en polvo al 5% en PBS-T pH 7.5 (fosfato de sodio dibásico 80 mM, fosfato de sodio monobásico 20 mM; NaCl 100 mM y Tween 20 al 0.1%) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Después se realizaron dos lavados de 20 min con PBS-T y las membranas se incubaron en agitación durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo comercial (antiCAT). Después, se realizaron otros dos lavados de 20 min con PBS-T, seguido de la incubación a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h, después de la cual se realizaron dos lavados más de 20 min con PBS-T. Los anticuerpos unidos a la membrana se visualizaron usando un sistema de detección que emplea quimioluminiscencia.

Solución usada para western blot.

Amortiguador PBS-T. Mezclar 2.42g de Tris base (20 mM), 8 g de cloruro de sodio (137 mM), 3.8 ml 1M HCl y 1 ml de Tween 20 en 1 L de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.6 con hidróxido de sodio

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

XI. REFERENCIAS.

- 1 Khaper N, Riggatto C, Seneviratne C, Li T, Singal PK. Chronic treatment with propranolol induces antioxidant changes and protects against ischemia-reperfusion injury *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:3335-3344.
- 2 Sela S, Shasha SM, Mashiah E, Haj M, Kristal B, Shkolnik T. Effect of oxygen tension on activity of antioxidant enzymes and on renal function of the postischemic reperfused rat kidney *Nephron* 1993;63:199-206.
- 3 Barnard ML, Snyder SJ, Engerson TD, Turrens JF. Antioxidant enzyme status of ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats *Free Radic Biol Med* 1993;15:227-232.
- 4 Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species *Physiol Rev* 1994;74:139-162.
- 5 Oury TD, Crapo JD, Valnickova Z, Enghild JJ. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* 1996;317:51-57.
- 6 Bannister JV, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987;22:111-180.
- 7 Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function *Kidney Int* 1994;45:1-9.
- 8 Aebi HE. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 1982.
- 9 Price VE, Sterling WR, Tarantola VA, Hartley RW, Rechcigl M. The kinetics of catalase synthesis and destruction *in vivo*. *J Biol Chem* 1962;237:3468-3475.
- 10 Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989;79:279-288.
- 11 Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Selenocysteine in Glutathione Peroxidase* 1978;17:2639-2644.
- 12 Hill KE, Lyons PR, Burk RF. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:260-263.
- 13 Burk RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 1991;5:2274-2279.
- 14 Yoshimura S, Suemizu H, Taniguchi Y, Arimori K, Kawabe N, Moriuchi T. The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32. *Gene* 1994;145:293-297.
- 15 Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto Y, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences *J Biochem* 1990;108:145-148.
- 16 Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney *J Biochem* 1991;109:918-923.
- 17 Takahashi K, Avissar N, Whithin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987;256:677-686.
- 18 Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *In situ* reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem* 1990;265:454-461.
- 19 Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH, Doan K, Liu XF. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in human and rodents *Blood* 1992;79:3233-3238.
- 20 Avissar N, Siemmon JR, Palmer IS, Cohen HJ. Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunologic identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme. *J Nutr* 1991;121:1243-1249.

21. Maddipati KR, Marnett LJ. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J Biol Chem* 1987;262:17398-17403
22. Yoshimura S, Suemizu H, Nomoto Y, Sakai H, Katsuoka Y, Kawamura N, Moriuchi T. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. *Nephron* 1996;73:207-211.
23. Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys* 1994;309:239-246
24. Avissar NS, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubule are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994; 266 C367-C365.
25. Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 1994;269:27066-27073.
26. Chu FF, Esworthy RS. The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch Biochem Biophys* 1995;323:288-294.
27. Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993;268:2571-2576.
28. Sunde RA. Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 1990;10:451-474.
29. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1985;839:62-70.
30. Maiorino M, Chu FF, Ursini F, Davies KJA, Doroshow JH, Esworthy RS. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem* 1991;266:7728-7732.
31. Weitzel F, Ursini F, Wendel A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta* 1990;1036:88-94.
32. Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rats testis. *J Biol Chem* 1992;267:6142-6146.
33. Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 1994;269:7342-7348.
34. Schuckelt R, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Roveri A, Reumkens J, Strabburger W, Ursini F, Wolf B, Flohé L. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a seleno-enzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Rad Res Comms* 1991;14:343-361.
35. Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. In: *Antioxidant Nutrients and Immune Functions*. Bendich A, Phillips M, Tengerdy RP (eds) Plenum Publishing Corporation, 1990.
36. van den Branden C, Verelst R, Vamecq J, Vanden Houte K, Verbeelen D. Effect of vitamin E on antioxidant enzymes, lipid peroxidation products and glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *Nephron* 1997;76:77-81.
37. Kavutcu M, Candolat O, Öztürk S, Olcay E, Ulutepe S, Ekinci C, Gökhan IH, Durak I. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissue from gentamicin-treated guinea pigs: Effects of vitamins E and C. *Nephron* 1996;72:269-274.
38. Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993;69:261-274.
39. Gulati S, Singh AK, Irazu C, Orak J. Ischemia-reperfusion injury: biochemical alterations in peroxisomes of rat kidney. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295:90-100.
40. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int* 1990;38:282-288.
41. Honda N, Hishida A. Pathophysiology of experimental nonoliguric acute renal failure. *Kidney Int* 1993;43:513-521.
42. Guyton CA. *Tratado de fisiología médica Interamericana*. 5ª edición. México, 1977.

- 43 Gwinner W, Deters-Evers U, Brandes RP, Kubat B, Koch KM, Pape M, Olbricht CJ. Antioxidants-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney. *J Physiol* 1998;509:599-606.
- 44 Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: Some recent research. *Gen Pharmacol* 1995;26:1477-1487.
- 45 Calderón E. Pasado, presente y futuro de la Gentamicina. Schermax/Schering-Plough, Mexico, 1996.
- 46 Bennett WM, Mela-Riker LM, Houghton DC, Gilbert DN, Buss WC. Microsomal protein synthesis inhibition: an early manifestation of gentamicin nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1988;255:F265-F269.
- 47 Nakajima T, Hishida A, Kato A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 1994;266:F425-F431.
- 48 Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1988;81:334-341.
- 49 Ramsammy LS, Josepovitz C, Ling KY, Lane B.P., Kaloyanides J. Effects of diphenylphenylenediamine on gentamicin-induced lipid peroxidation and toxicity in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;238:83-88.
- 50 Ramsammy LS, Josepovitz C, Lane B.P., Kaloyanides J. Polyaspartic acid protects against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;250:149-153.
- 51 Elfarrar AA, Duescher RJ, Sausen PJ, O'Hara TM, Cooley AJ. Methimazole protection of rats against gentamicin-induced nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 1994;72:1238-1244.
- 52 Avasthi PS, Luft FC, Huser J.W. Effect of gentamicin on glomerular ultrastructure. *J Lab Clin Med* 1981;98:444-454.
- 53 Gattone II VH, Evans AP, Mong SA, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC. The morphology of the renal microvasculature in glycerol-and gentamicin-induced acute renal failure. *J Lab Clin Med* 1982;101:183-195.
- 54 Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 1981;19:288-296.
- 55 Baylis C, Renke HR, Brenner BM. Mechanisms of the defect in glomerular ultrafiltration associated with gentamicin administration. *Kidney Int* 1977;12:344-353.
- 56 Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Schor N. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1991;40:742-747.
- 57 Silverblatt FJ, Kuehn C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 1979;15:335-345.
- 58 Kacew S. Inhibition of gentamicin-induced nephrotoxicity by piridoxal-5-phosphate in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:360-366.
- 59 Jones DB, Elliott WC. Gentamicin-Induced Loss of Basolateral Surface Area of Rat Proximal Convoluted Tubules. *Lab Invest* 1987;57:412-420.
- 60 Sastrasinh M, Weinberg JM, Humes HD. The effect of gentamicin on calcium uptake by renal mitochondria. *Life Sci* 1982;30:2309-2315.
- 61 Weinberg JM. Aminoglycoside nephrotoxicity. The role of cell calcium overload in nephrotoxic renal tubular cell injury. *Am J Kidney Dis* 1986;VIII:284-291.
- 62 Weinberg JM, Humes HD. Mechanisms of Gentamicin-Induced Dysfunction of Renal Cortical Mitochondria. I. Effects on mitochondrial respiration. *Arch Biochem Biophys* 1980;205:222-231.
- 63 Simmons CF, Ronald TB, Humes HD. Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214:709-715.
- 64 Wellwood JM, Lovell D, Thompson AE, Tighe JR. Renal damage caused by gentamicin. A study of the effects on renal morphology and urinary enzyme excretion. *J Pathol* 1976;118:171-182.
- 65 Weinberg JM, Harding PG, Humes HD. Mechanisms of gentamicin-induced dysfunction of renal cortical mitochondria. II. Effects on mitochondrial monovalent cation transport. *Arch Biochem Biophys* 1980;205:232-239.
- 66 Walker PD, Shah SV. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 1987;253:C495-C499.

67. Ueda N, Guidet B, Shah SV. Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 1993;265:F435-F439.
68. Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1749-1752.
69. Fauconneau B, Tallineau C, Huguet F, Priou A. Gentamicin-induced kidney damage and lipid peroxidation in rats. *Toxicol Lett* 1995;76:127-134.
70. Williams PD, Holohan PD, Ross CR. Gentamicin nephrotoxicity. I. Acute biochemical correlates in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;61:234-242.
71. Yang CL, Du XH, Han YX. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* 1995;17:21-26.
72. Sha S-H, Schacht J. Formation of reactive species following bioactivation of gentamicin. *Free Radic Biol Med* 1999;26:341-347.
73. Ramsammy LS, Ling K.Y, Josepovitz C., Levine R., Kaloyanides J. Effect of gentamicin on lipid peroxidation in rat renal cortex. *Biochem Pharmacol* 1985;34:3895-3900.
74. Ali BH, Bashir AK. Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol* 1996;27:349-353.
75. Yang CL, Du HH, Zhao JH, Chen W, Han YX. Zinc-induced metallothionein synthesis could protect from gentamicin nephrotoxicity in suspended proximal tubules of rats. *Ren Fail* 1994;16:61-69.
76. Sandhya P, Mohandass S, Varalakshmi P. Role of DL α -lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity. *Mol Cell Biochem* 1995;145:11-17.
77. Ramsammy LS, Josepovitz C, Ling KY, Lane BP, Kaloyanides GJ. Failure of inhibition of lipid peroxidation by vitamin E to protect against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Biochem Pharmacol* 1987;36:2125-2132.
78. Sandhya P, Varalakshmi P. Effect of lipoic acid administration on gentamicin-induced lipid peroxidation in rats. *J Appl Toxicol* 1997;17:405-408.
79. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 1985; 252:114-119.
80. Morris VC, Levander OA. Selenium content of foods. *J Nutr* 1970;100:1383-1388.
81. Block E, Cai XJ, Uden PC, Zhang X, Quimby BD, Sullivan JJ. *Allium* chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl Chem* 1996;68:937-944.
82. Apitz-Castro R, Cabrera S, Cruz MR, Ledezma E, Jain MK. Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thromb Res* 1983;32:155-169.
83. Cellini L, Di Campli E, Masulli M, Di Bartolomeo S, Allocati N. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;13:273-277.
84. Horie T, Murayama T, Mishima T, Itoh F, Minamide Y, Fuwa T, Awazu S. Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med* 1989;55:506-508.
85. Török B, Belágyi J, Rietz B, Jacob R. Effectiveness of garlic on the radical activity in radical generating systems. *Arzneimittelforschung* 1994;44:608-611.
86. Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Rancey BL. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Mol Cell Biochem* 1996;154:55-63.
87. Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R. Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1993;119:143-150.
88. Numagami Y, Suto S, Ohnishi ST. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts. A possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* 1996;29:135-143.
89. Singh SP, Abraham SK, Kesavan PC. In vivo radioprotection with garlic extract. *Mutat Res* 1995;345:147-153.
90. Lewin G, Popov I. Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 2nd communication: inhibition of the Cu^{2+} -initiated oxidation of low density lipoproteins. *Arzneimittelforschung* 1994;44:604-607.
91. Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Rancey BL. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* 1995;148:183-189.

- 92 Augusti KT, Shoola CG. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* 1996;52:115-119.
- 93 Inai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 1994;60:417-420.
- 94 Yeh YY, Yeh SM. Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. *Lipids* 1994;29:189-193.
- 95 Adoga GI. The mechanism of the hypolipidemic effect of garlic oil extract in rats fed on high sucrose and alcohol diets. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;142:1046-1052.
- 96 Kumar RVO, Banerji A, Kurup CKR, Ramasarma T. The nature of inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by garlic-derived diallyl disulfide. *Biochim Biophys Acta* 1991;1078:219-225.
- 97 Focke M, Feld A, Lichtenthaler HK. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS Lett* 1990;261:106-108.
- 98 Oi Y, Kawada T, Kitamura K, Oyama F, Nitta M, Kominato Y, Nishimura S, Iwai K. Garlic supplementation enhances norepinephrine secretion, growth of brown adipose tissue, and triglyceride catabolism in rats. *J Nutr Biochem* 1995;6:250-255.
- 99 Amagase H, Schaffer EM, Milner JA. Dietary components modify the ability of garlic to suppress 7, 12 - dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary DNA adducts. *J Nutr* 1996;126:817-824.
- 100 Qureshi AA, Din ZZ, Abuirmelch N, Burger WC, Ahmad Y, Elson CE. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: Impact on serum lipids. *J Nutr* 1983;113:1746-1755.
- 101 Chang MLW, Johnson MA. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J Nutr* 1980;110:931-936.
- 102 Heintz H, Betz E. Effects of dietary garlic supplementation in a rat model of atherosclerosis. *Arzneimittelforschung* 1994;44:614-617.
- 103 Das T, RoyChoudhury A, Sharma A, Talukder G. Modification of cytotoxic effects of inorganic arsenic by a crude extract of *Allium sativum* L. in mice. *Int J Pharmacog* 1993;31:316-320.
- 104 RoyChoudhury A, Das T, Sharma A, Talukder G. Dietary garlic extract in modifying clastogenic effects of inorganic arsenic in mice: two-generation studies. *Mutat Res* 1996;359:165-170.
- 105 Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Medina-Campos ON, Granados MA, Franco M. Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 1998;62:PL71-PL77.
- 106 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 107 Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. Effect of the *in vivo* catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:245-253.
- 108 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
- 109 Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952-958.
- 110 Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 1984;105:121-126.
- 111 Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl-b-D-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 1976;69:85-91.
- 112 Patel V, Luft FC, Yum MN, Patel B, Zeman W, Kleit SA. Enzymuria in gentamicin-induced kidney damage. *Antimicrob Agents Chemother* 1975;7:364-369.
- 113 Jung K, Priem F, Klotzck S, Becker S, Henke W. Methods compared for determining activity of N-acetyl-b-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: Different sensitivity and species effect. *Enzyme* 1991;45:215-221.
- 114 Correa-Rotter R, Mariash CN, Rosenberg ME. Loading and transfer control for northern hybridization. *Biotechniques* 1992;12:154-158.
- 115 Weinberg JM, Hunt D, Humes HD. Distribution of gentamicin among subcellular fractions from rat renal cortex. *Biochem Pharmacol* 1985;34:1779-1787.

116. Stratta P, Segoloni GP, Canavese C, Muzio G, Doghiani M, Scrra A, Allemandi P, Salomone M, Caramellino C, Canuto R. Oxygen free radicals are not the main factor in experimental gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* 1994;16:445-455.
117. Thibault N, Grenier L, Simard M, Bergeron MG, Beauchamp D. Protection against gentamicin nephrotoxicity by daptomycin in nephrectomized rats. *Life Sci* 1995;56:1877-1887.
118. Duque I, Garcia-Escribano C, Rodriguez-Puyol M, Diez-Marqués ML, López-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodriguez-Puyol D. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 1992;263:F466-F473.
119. Rodriguez-Barbero A, Rodriguez-López AM, González-Sarmiento R, López-Novoa JM. Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet activating factor. *Kidney Int* 1995;47:1346-1353.
120. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Olivares IM, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. Garlic ameliotates gentamicin (GM) nephrotoxicity: role of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD). *J Am Soc Nephrol* 1999;10:638A.
121. Rivas-Cabañero L, López-Novoa JM, Arévalo M. Effect of N^o-nitro-L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Nephron* 1995;71:203-207.
122. Rivas-Cabañero L, Montero A, López-Novoa JM. Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. *Eur J Pharmacol* 1994;270:119-121.
123. Rivas-Cabañero L, Rodriguez-López AM, Martínez-Salgado C, Saura M, Lamas S, López-Novoa JM. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp Nephrol* 1997;5:23-30.
124. Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Schor N. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1991;40:742-747.
125. Camussi G. Potencial role of platelet-activating factor in renal pathophysiology. *Kidney Int* 1986;29:469-477.
126. Santos JC, Sanz E, Caramelo C, Hernando L, López-Novoa JM. Effect of PAF-acether on renal function in dogs. *Kidney Int* 1985; 28:287.
127. Neuwirth R, Satriano JA, De Candido S, Clay K, Schlondorff D. Angiotensin II causes formation of platelet activating factor in cultured rat mesangial cells. *Circ Res* 1989;64:1224.
128. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982;257:5751-5754.
129. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985;240:500-508.
130. Rister M, Baehner RL. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest* 1976;58:1174-1184.
131. Ngaha EO, Ogunleye IO, Madusolumuo MA. Protection of selenium against gentamicin-induced renal damage in the rat. *J Biochem* 1984;95:831-837.
132. Yoshimura S, Takekoshi S, Watanabe K, Fujii-Kuriyama Y. Determination of nucleotide sequence of cDNA coding rat glutathione peroxidase and diminished expression of the mRNA in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:1024-1028.
133. Wei Z, Lau BHS. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 1998;18:61-70.
134. Geng Z, Lau BHS. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 1997;11:54-56.
135. Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME. Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor- β 1 and collagen gene expression. *Kidney Int* 1998;53:367-381.
136. Ohtake T, Kimura M, Nishimura M, Hishida A. Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin-induced nephropathy. *J Lab Clin Med* 1997;129:81-88.
137. Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1993;125:97-104.
138. Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int* 1996;50:1032-1043.

139. Lai C-C, Peng M, Huang L, Huang W-H, Chiu TH. Chronic exposure of neonatal cardiac myocytes to hydrogen peroxide enhances the expression of catalase. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1157-1163.
140. Tacchini L, Pogliaghi G, Radice L, Bernelli-Zazzera A, Cairo G. Post-transcriptional control of increased hepatic catalase gene expression in response to oxidative stress. *Redox Rep* 1996;2:273-278.
141. Gwinner W, Landmesser U, Brandes RP, Kubat B, Plasger J, Eberhard O, Koch KM, Olbricht CJ. Reactive oxygen species and antioxidant defense in puromycin aminonucleoside glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1722-1731.
142. Clerch LB, Iqbal J, Massaro D. Perinatal rat lung catalase gene expression: influence of corticosteroid and hyperoxia. *Am J Physiol* 1991;260:L428-L433.
143. Dhahbi JM, Tillman JB, Cao S, Mote PL, Walford RL, Spindler SR. Caloric intake alters the efficiency of catalase mRNA translation in the liver of old female mice. *J Gerontol* 1998;53A:B180-B185.
144. Chen L, Hong J-Y, So E, Hussin AH, Cheng W-F, Yang CS. Decrease of hepatic catalase level by treatment with diallyl sulfide and garlic homogenates in rats and mice. *J Biochem Mol Toxicol* 1999;13:127-134.
145. Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares IM, Medina-Campos ON, Ibarra-Rubio ME and Pedraza-Chaverri J. Post-transcriptional control of renal and hepatic catalase expression in garlic-treated rats. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:632A (Abstract).
146. Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 1996;10:340-341.
147. Simmons T, Jamali I. Relative importance of intracellular glutathione peroxidase and catalase in vivo for prevention of peroxidation to the heart. *Cardiovasc Res* 1989;23:774-779.
148. Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contribution of catalase y glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 1981;210:516.