

164



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

"EVALUACION DEL ESTADO ANTIOXIDANTE  
ENZIMATICO EN EL RIÑON DE RATAS  
HIPOTIROIDEAS DURANTE LA  
ISQUEMIA Y REPERFUSION"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA - BIOLOGA  
P R E S E N T A

VERONICA MONICA TENORIO VELAZQUEZ



MEXICO, D. F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



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.

Paginación

Discontinua

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** PROF. LAURA PENICHE VILLALPANDO  
**VOCAL:** PROF. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ  
**SECRETARIO:** PROF JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ  
**1er. SUPLENTE:** PROF. MARTHA LETICIA JIMÉNEZ PARDO  
**2o SUPLENTE:** PROF. ROSALINDA VELÁZQUEZ SALGADO

**LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**  
**LABORATORIO 209, EDIFICIO B, FACULTAD DE QUÍMICA Y**  
**DEPARTAMENTO DE NEFROLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE**  
**CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ**



**ASESOR: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ**



**SUSTENTANTE: VERÓNICA MÓNICA TENORIO VELÁZQUEZ**

## AGRADECIMIENTOS:

Primeramente a mi Dios por haberme permitido llegar tan lejos y por ser mi guía, mi luz y mi fortaleza, porque durante tantos años me dio consuelo y alegría en los momentos difíciles. Después a mi familia por haberme dado los valores y el carácter para seguir en la vida, gracias a mi mamá por ser el mejor ejemplo que puedo tener, gracias a mi papá, gracias a mi hermana por ser mi mejor amiga y mi compañía y gracias a Julio. Gracias a todos por ser personas tan especiales para mí. Gracias también a mi abuelito Tan porque me dio las palabras que necesitaba y por ser un ejemplo de lucha permanente.

Gracias a Oswaldo por apoyarme a terminar este trabajo que es un esfuerzo de ambos, por estar conmigo en los momentos fáciles y difíciles y porque es una parte muy importante de mi vida.

Gracias al Maestro Raúl Garza por el apoyo que recibí de él durante mi desempeño académico.

Gracias al Dr. Pedraza por su apoyo y a todos los integrantes del laboratorio 209 por su ayuda y sus conocimientos que tan amablemente me compartieron. Gracias a la Dr. María Elena Ibarra, Dr. Martha Menjivar, Perla, Omar, Laura, Raymundo, Diana, Yebel, Rocio, Alejandra, Violeta, Paty Santos, Ivonne y Angeles.

Gracias a la Dra. Franco por su tiempo y dedicación para enseñarme la técnica de isquemia y reperfusión y también a la Dra. Tapia por su gran colaboración en este trabajo, ya que sin su ayuda no se hubiera terminado el trabajo en el tiempo planeado.

*Este trabajo se lo dedico a mi abuelita Lichonita y a mi tía Elba, pues sé que muy lejos están y que ya no volverán, espero que alguna vez puedan ver cuanto las ame y las siga amando por siempre.*

## ABREVIATURAS

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>ANOVA</b>               | <b>Análisis de varianza</b>                                  |
| <b>BUN</b>                 | <b>Nitrógeno de urea en el plasma sanguíneo (del inglés)</b> |
| <b>CAT</b>                 | <b>Catalasa</b>  |
| <b>Cu-Zn SOD</b>           | <b>Superóxido dismutasa de cobre y zinc</b>                  |
| <b>DIT</b>                 | <b>Diyodotiroxina</b>  |
| <b>DS</b>                  | <b>Desviación estándar</b>                                   |
| <b>EDTA Na<sub>2</sub></b> | <b>Etilendinitrilotetracetato disódico</b>                   |
| <b>ERO</b>                 | <b>Especies reactivas del oxígeno</b>                        |
| <b>GPx</b>                 | <b>Glutación peroxidasa</b>                                  |
| <b>GRed</b>                | <b>Glutación reductasa</b>                                   |
| <b>GSH</b>                 | <b>Glutación reducido</b>                                    |
| <b>GSSG</b>                | <b>Glutación oxidado</b>                                     |
| <b>h</b>                   | <b>horas</b>   |
| <b>I/R</b>                 | <b>Isquemia y reperfusión</b>                                |
| <b>ICAM-1</b>              | <b>Molécula intracelular de adhesión 1 (del inglés)</b>      |
| <b>IRA</b>                 | <b>Insuficiencia renal aguda</b>                             |
| <b>ISQ</b>                 | <b>Isquemia</b>  |
| <b>MIT</b>                 | <b>Monoyodotiroxina</b>                                      |
| <b>Mn-SOD</b>              | <b>Superóxido dismutasa de manganeso</b>                     |
| <b>NADPH</b>               | <b>Nicotín adenín dinucleótido fosfato, forma reducida</b>   |
| <b>NBT</b>                 | <b>Nitroazul de tetrazolio (del inglés)</b>                  |
| <b>NS</b>                  | <b>No significativo</b>                                      |
| <b>NTA</b>                 | <b>Necrosis tubular aguda</b>                                |
| <b>PTU</b>                 | <b>Propiltiouracilo</b>                                      |
| <b>RIA</b>                 | <b>Radioinmunoanálisis</b>                                   |
| <b>SOD</b>                 | <b>Superóxido dismutasa</b>                                  |
| <b>SOD-EC</b>              | <b>Superóxido dismutasa extracelular</b>                     |
| <b>T<sub>3</sub></b>       | <b>Triyodotironina</b>                                       |
| <b>T<sub>4</sub></b>       | <b>Tiroxina</b>  |
| <b>TSH</b>                 | <b>Hormona estimuladora de la tiroides</b>                   |
| <b>VFG</b>                 | <b>Velocidad de filtración glomerular</b>                    |

## RESUMEN

Hay evidencias de que las especies reactivas de oxígeno y la disminución de las enzimas antioxidantes participan en el daño renal inducido por isquemia y reperfusión (I/R). En el hipotiroidismo se ha observado que hay protección contra el daño renal ocasionado por I/R. Aunque se desconoce el mecanismo de este efecto protector; es posible que las enzimas antioxidantes pudieran jugar un papel en este efecto. El objetivo de la tesis es determinar la actividad basal de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) y los cambios de la actividad de estas enzimas en respuesta a la I/R. Este efecto protector podría ser explicado por una mayor actividad basal de las enzimas antioxidantes en las ratas hipotiroideas y/o por una menor disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, secundaria a la I/R en estas mismas ratas. El grupo experimental fue de ratas macho Wistar de 320 a 360 g de peso corporal, quince días después de la tiroidectomía. Como control se utilizaron ratas de la misma cepa y peso que las hipotiroideas. Ambos grupos de ratas se sometieron a uninefrectomía del riñón derecho y a I/R del izquierdo. Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos después del inicio de la reperfusión (24, 48 y 72 horas) para obtener la sangre y el riñón, el cual se separó en tres partes (corteza, médula externa y médula interna). En las muestras de sangre se midió la creatinina y el nitrógeno de urea para evaluar el daño renal, y en los homogenados renales se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes. El aumento en la creatinina y el nitrógeno de urea fue menor en las ratas hipotiroideas lo que indica que el daño renal fue menos severo en este grupo. La actividad basal de las enzimas antioxidantes fue similar en las ratas hipotiroideas, excepto en la superóxido dismutasa la cual aumentó en un 8% en la corteza renal con respecto a las normales. Tampoco se observó una menor disminución en las actividades de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en el grupo de ratas hipotiroideas cuando se compararon con las ratas normales en las regiones estudiadas. Sin embargo se observó que en médula interna la actividad de glutatión peroxidasa en las hipotiroideas se recupera a las 72 horas. La actividad de superóxido dismutasa en la corteza renal se mantuvo constante a lo largo del tiempo de reperfusión en las ratas hipotiroideas. Con respecto a la actividad de catalasa en corteza se observó que esta tiene una menor disminución en las ratas hipotiroideas que en las normales y que la actividad de esta enzima en las ratas hipotiroideas mantuvo valores mayores durante el tiempo de reperfusión. La conclusión es que la protección contra el daño por I/R renal, observada en las ratas hipotiroideas no puede atribuirse esencialmente a la regulación diferencial de las enzimas antioxidantes ante la I/R o a las diferencias en la actividad basal de estas enzimas.



# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| 1.1. Especies reactivas del oxígeno (ERO).....  | 1  |
| 1.2. Formación de las ERO.....  | 2  |
| 1.3. Defensas naturales contra los radicales libres generados en condiciones fisiológicas (enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos)..... | 4  |
| 1.4. Función renal.....   | 6  |
| 1.5. Isquemia y reperfusión.....  | 6  |
| 1.6. Eutiroidismo e hipotiroidismo .....  | 10 |
| 2. JUSTIFICACIÓN .....  | 14 |
| 3. OBJETIVOS .....  | 15 |
| 3.1. Generales.....   | 15 |
| 3.2. Particulares.....  | 15 |
| 4. HIPÓTESIS .....  | 16 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 17 |
| 5.1. Materiales.....  | 17 |
| 5.2.1. Reactivos .....  | 17 |
| 5.2.2. Animales .....   | 17 |
| 5.2. Diseño experimental.....   | 17 |
| 5.2.3. Tiroidectomía.....   | 18 |
| 5.2.4. Isquemia-reperfusión .....   | 18 |
| 5.3. Métodos empleados .....  | 19 |
| 5.3.1. Determinaciones analíticas .....   | 19 |
| 5.3.2. Determinaciones enzimáticas .....  | 20 |
| 5.4. Análisis estadístico .....   | 25 |
| 6. RESULTADOS .....   | 26 |
| 6.1. Peso corporal y por ciento de mortalidad.....  | 26 |
| 6.2. Creatinina y nitrógeno de urea en sangre .....   | 27 |
| 6.3. Actividad de catalasa .....  | 30 |
| 6.4. Actividad de glutatión peroxidasa .....  | 34 |
| 6.5. Actividad de superóxido dismutasa.....   | 37 |
| 7. RESUMEN DE RESULTADOS .....  | 40 |
| 8. DISCUSIÓN .....  | 42 |
| 9. CONCLUSIONES.....  | 45 |
| 10. PERSPECTIVAS.....   | 46 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA .....  | 47 |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Especies reactivas del oxígeno (ERO)*

Las moléculas que participan en las reacciones químicas como aceptores son conocidas como oxidantes o radicales, debido a que en su orbital más externo se encuentra al menos un electrón desapareado. Estas especies son reactivas ya que buscan completar su último par electrónico y reaccionan o sustraen electrones, de esta manera se convierten en radicales. Siendo un ejemplo de lo anterior el oxígeno bimolecular, el cual es un componente esencial para los organismos aeróbicos, sin embargo en altas concentraciones es tóxico debido a la producción de especies reactivas de oxígeno. La formación de estas especies se da a partir de la reducción incompleta del oxígeno, siendo principalmente tres especies las que se forman: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Figura 1.1). El anión superóxido se origina a partir de la incorporación de un electrón a la molécula de oxígeno, es un agente tóxico porque puede difundir a través de las membranas y eventualmente, bajo ciertas condiciones, puede dar lugar a la aparición de agentes más reactivos como sería el radical hidroxilo. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre debido a que no posee electrones desapareados sin embargo es un agente que puede difundirse hasta llegar a zonas donde hay pocas defensas antioxidantes y en presencia de halógenos o mieloperoxidasa puede generar ácidos hipohalosos (28) o bien participar en la formación del radical hidroxilo, la concentración de esta especie depende de la ausencia o presencia de las enzimas encargadas de su eliminación. El radical hidroxilo es uno de los agentes más reactivos ya que perturba la vecindad inmediata a su sitio de generación reaccionando con todas las moléculas biológicas. Contra este radical la célula no tiene mecanismos antioxidantes enzimáticos directos sino que lo destoxifica por medio de antioxidantes no enzimáticos como es el caso de la vitamina C y el glutatión (17), además de que previene su formación por medio de enzimas antioxidantes.

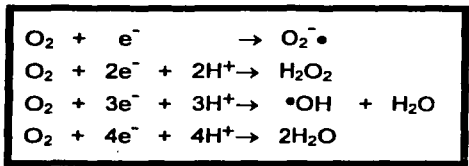


Figura 1.1. Producción de especies reactivas de oxígeno por medio de la vía univalente de la reducción del oxígeno.

**1.2. Formación de las ERO**

El anión superóxido se genera principalmente a partir de: (i) las reacciones de la xantina oxidasa durante el catabolismo de las bases púricas, (ii) la NADPH oxidasa presente en muchas células endoteliales y en las células de la respuesta inmune (Figura 1.2) y (iii) la autooxidación de varias moléculas dentro de las cuales se encuentran la ubisemiquinona en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, las catecolaminas y la hemoglobina (Figura 1.3) (25). También se cree que el anión superóxido puede representar un papel importante en el proceso inflamatorio (48). El peróxido de hidrógeno se genera como consecuencia de la dismutación del anión superóxido en solución acuosa. El radical hidroxilo se genera cuando el peróxido de hidrógeno interacciona con el anión superóxido bajo el efecto catalítico de un metal de transición como el hierro (Figura 1.4), también se puede generar a partir de la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido de hidrógeno lo cual da como resultado dos radicales hidroxilo.

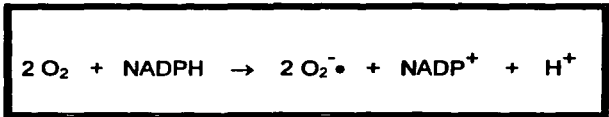


Figura 1.2. Reacción que cataliza el complejo multienzimático de la NADPH oxidasa.

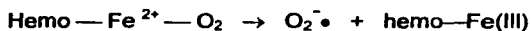


Figura 1.3. Reacción de la autooxidación del grupo hemo contenido en la hemoglobina.

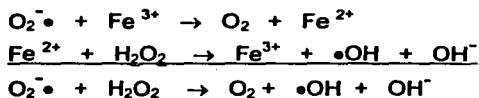


Figura 1.4. Generación del radical hidroxilo (Reacción de Fenton).

Las ERO se generan durante los procesos fisiológicos de la célula debido al mecanismo oxidativo, siendo la mitocondria un organelo importante para la generación de las ERO, al llevarse a cabo la fosforilación oxidativa. El transporte de electrones no es 100% eficiente y algunos electrones escapan de la cadena de transportes de electrones dando una reducción incompleta del oxígeno, iniciándose así la reducción univalente del oxígeno. Las ERO también se generan durante la oxidación de los xenobióticos y la eliminación bacteriana en los procesos infecciosos (16).

Estas especies reactivas ocasionan daño celular, actuando sobre una gran cantidad de moléculas biológicas como es el caso de los aminoácidos, los carbohidratos, los fosfolípidos y los ácidos nucleicos. Uno de los sustratos más susceptibles de autooxidación son los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, los cuales pueden sufrir de peroxidación (18, 49). Esto puede llevar a la alteración en la permeabilidad celular, hemólisis, deterioro general en el metabolismo celular y, finalmente, a la muerte celular.

### 1.3. Defensas naturales contra los radicales libres generados en condiciones fisiológicas (enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos)

Las células cuentan con numerosos mecanismos de protección contra los efectos dañinos de los radicales libres. El primer mecanismo que actúa es la reducción completa hasta la formación del agua, la cual es realizada por el sistema enzimático de la citocromo oxidasa (reducción tetravalente del oxígeno) (16). Otros mecanismos celulares incluyen a las enzimas antioxidantes como son la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la catalasa (Figura 1.4). También existen moléculas consideradas antioxidantes no enzimáticas, como son el glutatión, el ascorbato, la vitamina E, los  $\beta$ -carotenos y las proteínas localizadas en el citosol. En las células existe un balance entre la producción de las ERO y las enzimas antioxidantes, cuando este balance se rompe se genera el daño (19, 47, 52).

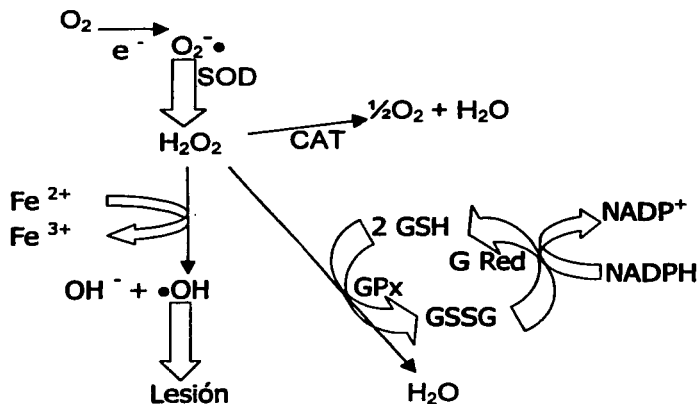


Figura 1.4. Las enzimas antioxidantes y las reacciones que catalizan. SOD= superóxido dismutasa, CAT= catalasa, GPx= glutatión peroxidasa y GRed= glutatión reductasa.

La superóxido dismutasa (óxido reductasa EC 1.15.1.1) cataliza la siguiente reacción:



En los mamíferos la SOD posee tres isomorfos; Mn-SOD, Cu-Zn SOD y la SOD-EC, las tres se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos y son producto de genes diferentes. Dos de estas isomorfos tienen Cu y Zn en su sitio activo y la tercera tiene Mn. Una isomorfa de Cu y Zn se localiza en el citosol y la otra es extracelular, en cambio la de Mn se localiza en la matriz mitocondrial. Las isomorfos de Cu-Zn catalizan la dismutación del anión superóxido a través de la reducción-oxidación del cobre y la isomorfa de Mn dismuta el anión superóxido al cambiar el estado de oxidación del manganeso (25).

La glutatión peroxidasa (glutatión:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductasa EC 1.11.1.9) destoxifica el peróxido de hidrógeno ya que cataliza la oxidación del glutatión reducido a GSSG (reacción 2), el cual a su vez es reducido por la enzima glutatión reductasa (GRed) en presencia del NADPH (reacción 3; Figura 1.4), siendo la forma activa de GPx dependiente de selenio.



La enzima catalasa (EC 1.11.1.6) es una hemoproteína con una vida media muy corta, 6 a 8 minutos, se encuentra principalmente en peroxisomas, cataliza la siguiente reacción:



Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se encuentra: la vitamina E cuya función es la de interrumpir la propagación de la lipoperoxidación; los carotenos y la bilirrubina cuyo papel es el de atrapar radicales peróxido; la vitamina C tiene la función de atrapar al radical hidroxilo y por último el glutatión reacciona con el radical hidroxilo, así como con los radicales libres orgánicos (25).

#### **1.4. Función renal**

Para este estudio se utilizó un modelo de daño renal, debido a que el riñón es uno de los órganos que generan ERO, porque consume aproximadamente el 10% del oxígeno corporal y tiene una alta vulnerabilidad al daño generado por las ERO (28).

La unidad funcional del riñón es la nefrona que está formada por el glomérulo, el cual es un nido de capilares siendo su entrada la arteriola aferente y su salida la arteriola eferente y a su vez está rodeado por la cápsula de Bowman. Además del glomérulo la nefrona tiene un túbulo proximal el cual está ubicado en la corteza, la parte más externa del riñón, este tubo se extiende hasta la médula y desciende formando el asa de Henle, constituida por una parte descendente y una ascendente. La parte ascendente entra a la corteza para convertirse en el túbulo distal dándole fin a la nefrona, los túbulos distales de varias nefronas se unen en un túbulo colector (22).

La función primaria del riñón es la de regular la presión sanguínea y el ambiente hídrico y electrolítico del organismo, es decir mantiene la homeostasia. Su función se realiza principalmente a través de cinco mecanismos: (i) formación de orina; (ii) regulación del balance de fluidos y electrolitos; (iii) regulación del balance ácido base; (iv) excreción de los productos de desecho del metabolismo; y (v) producción de sustancias endocrinas, como son la eritropoyetina, la renina y el precursor de la vitamina D (22).

#### **1.5. Isquemia y reperfusión**

El daño renal puede ser inducido por medio de isquemia y reperfusión. Estos son fenómenos que se dan *in vivo* al obstruir mecánicamente la arteria renal o todos los vasos renales, se da la isquemia y con el eventual reestablecimiento de la circulación, la reperfusión. La isquemia se caracteriza por el cese de la circulación a los tejidos así como la incapacidad de la remoción de los productos del metabolismo (27). Sin embargo en los seres humanos generalmente la lesión por isquemia se da como resultado de una hipoperfusión más que por una obstrucción vascular, esta hipoperfusión se puede dar como resultado de una falla cardiovascular, quemaduras graves o síndrome hemorrágico tóxico (27) siendo la excepción el trasplante en donde sí hay isquemia.

El daño que produce la I/R se define como una insuficiencia renal aguda en donde ocurre necrosis tubular aguda (NTA), la cual es una pérdida reversible de la función renal, siendo la severidad y el grado de los cambios morfológicos dependientes del tiempo de duración de la isquemia. La IRA en el ámbito de la clínica se caracteriza por un aumento de creatinina y urea en sangre, así como una disminución en la filtración glomerular (2).

La NTA se divide en tres etapas: (i) la etapa inicial se caracteriza por un decremento en la velocidad de filtración glomerular, acompañado por daño letal o subletal al epitelio tubular; también ocurren cambios en la ultraestructura, así como en las interacciones moleculares de la superficie celular, pérdida de la actividad de la ATPasa, alteraciones en el citoesqueleto y en el gradiente iónico intracelular; (ii) en la etapa establecida hay una persistente reducción de la velocidad de filtración glomerular (VFG), alteraciones en la respuesta hemodinámica, daño celular involucrado con la degradación autolítica de los túbulos, la separación de las células, rompimiento de membranas y la eventual pérdida de la integridad celular (10) y (iii) etapa de recuperación o diuresis en donde se regenera el epitelio celular dando como resultado su reestablecimiento estructural y funcional (28, 38).

La histología revela que el daño celular ocasionado por la I/R es mas bien subletal, en donde se observan que las microvellosidades de la membrana en borde de cepillo empiezan a desaparecer y a acortarse, lo que implica que hay pérdida en la eficiencia de la reabsorción celular, también empiezan a surgir vacuolas y aplastamiento de los túbulos proximales así como la dilatación de éstos, siendo éstos más afectados que los distales (27). La necrosis celular involucra a las células del segmento S3 del túbulo proximal. Existe infiltración celular al nivel de la médula renal, además de que el lumen del túbulo distal puede encontrarse ocluido por células en apoptosis. La apoptosis es dependiente del consumo de las reservas de ATP, de modo que si esta reserva se conserva ocurre apoptosis y si ocurre un decremento drástico entonces se da la necrosis (2, 28, 38).

En la I/R el aumento de las ERO es consecuencia de dos eventos: (A) la conversión de la enzima que cataboliza la hipoxantina a ácido úrico del tipo D al tipo O, siendo la enzima tipo D una deshidrogenasa la cual utiliza al  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones en la oxidación de hipoxantina a xantina. Sin embargo la tipo O es una oxidasa la cual utiliza oxígeno como aceptor de electrones y genera al anión superóxido. Uno de los



mecanismos propuestos para esta conversión involucra la baja concentración de ATP que ocasiona un incremento en el calcio citosólico (47) y este a su vez activa a una proteasa dependiente de calmodulina (Figura 1.5), la cual se encarga de la conversión ya sea por proteólisis o por medio de la oxidación de grupos sulfidrilos (48). (B) el incremento en la actividad de la xantina oxidasa, tipo O, el cual se da al haber un exceso de sustrato (hipoxantina), proveniente de la ruptura masiva de nucleótidos de adenosina (ecuación 5) debido al nivel bajo de energía en los tejidos. Recientemente se ha encontrado que la producción de adenosina también se incrementa durante el estrés oxidativo debido a que la actividad de la enzima 5' nucleotidasa (que convierte AMP en adenosina) aumenta con las ERO (6).

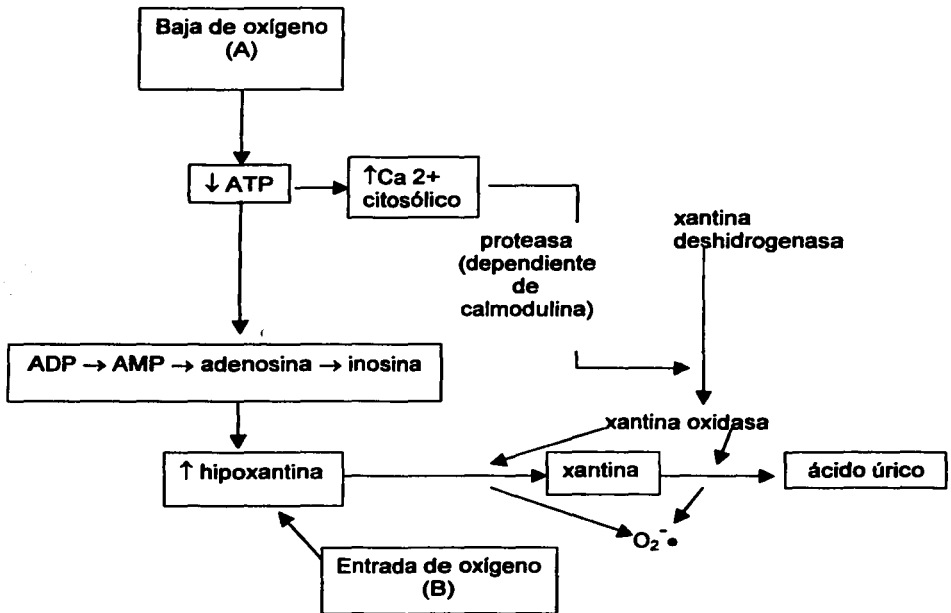


Figura 1.5. Eventos principales durante la isquemia (A) y reperfusión (B).

Otro factor que afecta al daño generado por la I/R, es el que se da en la reperfusión, en donde hay una entrada masiva de oxígeno molecular lo cual ocasiona una sobreproducción del anión superóxido, al igual que la entrada de leucocitos, los cuales generan daño, ya que producen más radicales libres para contener una supuesta infección bacteriana. Lo cual compromete la actividad de la SOD, de modo que si las defensas primarias, es decir las enzimas antioxidantes, que contienen a los radicales libres fallan se da la lipoperoxidación (10). Además de esto en la reperfusión están involucrados componentes típicos de la reacción inflamatoria, tal es el caso de la interleucina I, del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y de la molécula de adhesión celular ICAM-1, siendo esta última la responsable de la adhesión de los neutrófilos a los vasos peritubulares ocasionando una obstrucción, lo cual desencadena destrucción celular y la reducción de la VFG (51).

La hipótesis de que los radicales libres están involucrados en la patogénesis celular de la insuficiencia renal aguda inducida por I/R, se confirma al observar la protección de ciertos agentes antioxidantes de naturaleza vegetal, como el picroliv (40), ante la I/R. Otros hechos que apoyan esta hipótesis es que la inducción o la administración exógena de enzimas antioxidantes ocasiona protección (48), además de la evidencia que al administrar compuestos que atrapan a los radicales, como es el caso de la  $\alpha$ -fenil-N-terbutil-nitrona (PBN), el daño disminuye (35) o bien si se depletan las defensas antioxidantes al haber una superproducción de radical superóxido el cual inactiva a glutatión peroxidasa y catalasa (33), se exagera el daño ocasionado por I/R. Se ha observado que la lesión producida durante la I/R es menor, al disminuir o erradicar a los leucocitos o a los factores que estimulan la inflamación (48).

Se ha observado que durante la isquemia y reperfusión se alteran los antioxidantes no enzimáticos como es el glutatión el cual disminuye, la cantidad de proteínas permanece constante cuando el tiempo de la isquemia es corto y los niveles de ARNm mensajero disminuyen a medida que se incrementa tanto el tiempo de isquemia y reperfusión, obteniéndose los niveles mínimos de ARNm a los 90 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión (10). Siendo que en periodos largos de isquemia se afecta la actividad de las enzimas antioxidantes no tanto porque disminuya el ARNm sino porque se modifica la estructura de la proteína, ya que puede oxidarse. Por lo tanto la actividad de las enzimas antioxidantes se altera dependiendo del modelo animal y del tiempo de

duración tanto de la isquemia como de la reperfusión, lo cual observamos en la tabla siguiente:

Tabla 1.1. Actividad de las enzimas antioxidantes durante la I/R renal.

|                                    | SOD total | GPx | CAT |
|------------------------------------|-----------|-----|-----|
| <b>Yoshioka <i>et al.</i> (52)</b> |           |     |     |
| 3 días                             | =         | =   | =   |
| 6 días (30 min ISQ)                | ↑         | ↑   | ↑   |
| <b>Singh <i>et al.</i> (41)</b>    |           |     |     |
| 24h (90 min ISQ)                   | ↓         | ↓   | ↓   |
| <b>Dobashi <i>et al.</i> (10)</b>  |           |     |     |
| 24h (30 min ISQ)                   | =         | ↓   | =   |
| 24h (60 min ISQ)                   | ↓         | ↓   | ↓   |
| 24h (90 min ISQ)                   | ↔         | ↓↓  | ↓↓  |

(=) la actividad permanece sin cambios; (↑) la actividad aumenta; (↓) la actividad disminuye y (↓↓) la actividad disminuye más.

### 1.6. **Eutiroidismo e hipotiroidismo**

El eutiroidismo se define como un nivel normal de hormonas tiroideas séricas, en donde las células foliculares de la glándula tiroidea, las encargadas de producir las hormonas tiroideas (23), son funcionales. Existen dos hormonas principales secretadas por la glándula tiroidea: la tiroxina y la triyodotironina, que tienen como función la de regular el metabolismo general de la célula, como es la regulación de los carbohidratos, los lípidos, el metabolismo hídrico y electrolítico (4), la estimulación del consumo de oxígeno (3) y además regulan el mecanismo oxidativo de las mitocondrias.

Los principales reactivos para la síntesis de las hormonas tiroideas son la tirosina y el yodo, siendo el yodo el reactivo limitante, ya que la síntesis depende de la cantidad de yodo que ingrese a la glándula. En el intestino el yodo (I) es reducido a yoduro (I<sup>-</sup>) el cual se absorbe para ingresar a la glándula tiroidea por transporte activo y por la acción

de la hormona estimuladora de la tiroides, siendo esta glándula la que contiene alrededor del 90% del yodo corporal. La depuración del yodo proveniente de la glándula tiroidea es de entre 10 y 35 ml de plasma por minuto (42). Dentro de la glándula el yodo es oxidado por una peroxidasa para que sea incorporado a la tiroglobulina, una proteína de 140 residuos de tirosina, formando los precursores el MIT y el DIT y las hormonas tiroideas T3 (condensación de MIT y DIT) y T4 (condensación de dos DIT) (Figura 1.6), todos unidos a la tiroglobulina. Después este complejo es secretado al lado coloidal del folículo para ser almacenado y endocitado en respuesta a la hormona estimulante de la tiroides, la cual es secretada en la pituitaria. Dentro del folículo el complejo sufre un rompimiento proteolítico, al ser degradado por una proteasa lisosomal, dando como resultado la liberación de las hormonas tiroideas así como de sus precursores. Los precursores son deiodinizados, para el reciclamiento del yodo, en cambio las hormonas tiroideas son liberadas a la circulación donde viajan unidas a proteínas como son la globulina acarreadora de tiroxina y la albúmina en menor proporción. Tan solo una pequeña fracción de ambas hormonas es la que viaja libre y tiene actividad biológica, siendo la T3 la de mayor actividad y menor afinidad por el acarreador de hormonas tiroideas. Al llegar al tejido periférico se puede dar la conversión de T4 a T3 dependiendo de los estímulos hormonales dados (23). Estas hormonas probablemente ingresen a la célula por medio de difusión, después se unen a un receptor nuclear, se ha propuesto que el receptor nuclear de la T3 es un producto del gen *c-erb A* protooncogen, al darse esta unión se sintetiza el mRNA el cual está involucrado con la síntesis de proteínas y enzimas responsables del metabolismo (23). Otros postulados sobre el mecanismo de acción de estas hormonas son que activan a la mitocondria, estimulan a la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , activan las funciones membranales y la interacción con el sistema adrenérgico (23).

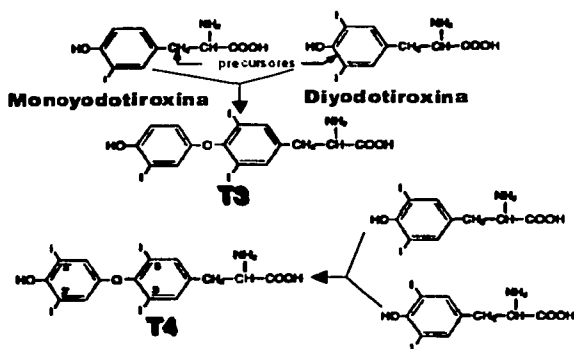


Figura 1.6. Estructura de la triyodotironina (T3) y la tiroxina (T4).

Al existir variaciones en la concentración de hormonas tiroideas en los niveles sanguíneos y falta o baja de estas en los tejidos, se establece el hipotiroidismo, el cual tiene las siguientes características: (i) pérdida rápida de peso; (ii) disminución del ritmo cardiaco, (iii) disminución en la actividad metabólica; (iv) bajos niveles séricos de T3 y T4; (v) bajo nivel sérico de TSH (3). La baja de hormonas tiroideas se logra en condiciones de enfermedad o bajo condiciones experimentales, ya sea mediante una cirugía o por sustancias químicas. Las enfermedades que cursan con hipotiroidismo son aquellas que tienen alteraciones en la glándula tiroidea, como ejemplo está la enfermedad de Hashimoto, la tiroiditis subaguda, la terapia con yodo, los tumores en la glándula, la deficiencia de yodo, la enfermedad congénita, las alteraciones en la pituitaria o en el hipotálamo (23). La cirugía remueve la glándula tiroidea, procedimiento que lleva por nombre tiroidectomía, también se puede producir hipotiroidismo mediante una tiroparatiroidectomía en donde se remueve tanto la tiroidea como la paratiroides. Las sustancias químicas utilizadas para producir hipotiroidismo son: PTU y metimazol (21), siendo el mecanismo del PTU el prevenir la utilización del yodo dentro de la glándula tiroidea (9) además de que inhibe la deiodinación periférica de T4 (44). El mecanismo de acción del metimazol es el de inhibir a la peroxidasa involucrada en la síntesis de las hormonas tiroideas (45).

La falta de hormonas tiroideas afecta la función de varios órganos dentro de los cuales se encuentra el riñón, en el cual se inhibe la maduración de las estructuras morfológicas excepto el glomérulo y el segmento S3 del túbulo proximal, disminuye la reabsorción de sodio en el túbulo proximal (8) además de la actividad de la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , y también disminuye la velocidad de filtración glomerular y el flujo plasmático renal (15). Sin embargo si el hipotiroidismo es de corta duración, alrededor de dos semanas, no se observan cambios morfológicos (3, 11).

El sistema antioxidante en el hipotiroidismo, según la bibliografía, no está definido como prooxidante u antioxidante, ya que hay reportes en ratas hipotiroideas con PTU de que la Mn-SOD y la Cu-Zn SOD disminuyen en el corazón y de que catalasa aumenta en corazón pero disminuye en hígado (1). Mientras que en otros informan que la SOD, CAT y GPx aumentan en el pulmón de las ratas hipotiroideas durante la etapa de gestación (44). Rodríguez-Pierce *et al.* (39) encontraron que los productos de la lipoperoxidación disminuyen en el hipotiroidismo en el pulmón de ratas recién nacidas, lo cual da como resultado un estado antioxidante. También se ha informado que la lipoperoxidación no cambia, que GPx aumenta en el corazón y permanece intacta en el hígado, mientras que la vitamina E disminuye en el hígado (50). Mano *et al.* (26) encontraron que la actividad de GPx aumenta y la de Mn-SOD disminuye en el cerebro de las ratas hipotiroideas.

Se ha observado que durante el hipotiroidismo hay protección contra la IRA ocasionada por isquemia y reperfusión (30), ya que los valores de creatinina y BUN son bajos, además la lipoperoxidación disminuye y el contenido basal de GSH en la corteza renal aumenta. Además la tiroxina exagera la toxicidad causada por el oxígeno (12). Esta protección en las ratas hipotiroideas también se da a nivel del hígado ya que los protones de la mitocondria tienen una menor probabilidad de fuga (5).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

**Las siguientes razones justifican este trabajo donde se explora si la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) se regulan diferencialmente en las ratas hipotiroideas ante la I/R.**

- 1) No se ha establecido el o los mecanismos por medio de los cuales las ratas hipotiroideas tienen menor daño renal por I/R.**
- 2) Los radicales libres de oxígeno participan en el daño renal por I/R.**
- 3) Las enzimas antioxidantes constituyen una línea de defensa contra los radicales libres de oxígeno.**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Generales**

- **Caracterizar el sistema antioxidante enzimático en el riñón de las ratas hipotiroideas después de la isquemia y la reperfusión renal, para determinar si la actividad de estas enzimas se regula de manera diferencial en el riñón de las ratas hipotiroideas sometidos a este reto oxidativo.**

#### **3.2. Particulares**

- **Reproducir en las condiciones establecidas el efecto protector.**
- **Determinar la actividad basal de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) en las ratas normales e hipotiroideas.**
- **Determinar los cambios de la actividad de las enzimas antioxidantes en respuesta a la isquemia y reperfusión renal en las ratas normales e hipotiroideas.**



#### **4. HIPÓTESIS**

**Una menor disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) y/o una mayor actividad basal de estas enzimas podría explicar el efecto protector renal observado en las ratas hipotiroideas ante la isquemia y reperfusión.**

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Materiales**

#### **5.2.1. Reactivos**

Se utilizaron los siguientes reactivos de Sigma (St Louis, MO): xantina, NBT, albúmina bovina, xantina oxidasa, NADPH, glutatión reductasa y GSH, así como las bolsas de diálisis. De JT Baker (México DF): el EDTA Na<sub>2</sub>, el sulfato de amonio y el cloruro de cobre. De Mallinckrodt: el carbonato de sodio y el peróxido de hidrógeno. De Merck (México, DF): la azida de sodio.

Las suturas, las gasas, la anestesia, los clips y los aplicadores con algodón fueron proporcionados por el laboratorio de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez.

#### **5.2.2. Animales**

Para la tiroidectomía se utilizaron ratas macho Wistar de 250-300 g de peso y el grupo de ratas normales fueron ratas macho Wistar de 320-360 g de peso. Al inicio de la isquemia y la reperfusión, el peso de las ratas de ambos grupos, fue similar (320 – 360 g). Todas las ratas fueron del bioterio del INCICH (Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez).

### **5.2. Diseño experimental**

Se utilizaron sesenta y cuatro ratas las cuales se dividieron en dos grupos, uno fue el grupo de ratas hipotiroideas al que se le hizo la tiroidectomía y el segundo grupo fue el de ratas normales. A su vez estos dos grupos se dividieron en cuatro para poder realizar un estudio temporal a las cero, veinticuatro, cuarenta y ocho y setenta y dos horas, respectivamente (30). Los aspectos evaluados fueron creatinina y nitrógeno de urea a partir de una muestra de sangre tomada de la cola y la actividad de las enzimas antioxidantes obtenidas a partir de las tres diferentes secciones del riñón (médula interna, médula externa y corteza), también se determinó la concentración de proteínas en el tejido renal. Durante todo el experimento los animales recibieron alimentación *ad*

*libitum*. Los valores obtenidos, en todas las determinaciones, para el tiempo cero de ambos grupos, se promediaron de acuerdo a su respectivo grupo. A los valores promediados se les llamó valores basales.

### 5.2.3. Tiroidectomía

La tiroidectomía es un procedimiento quirúrgico que se realizó de la siguiente manera: las ratas se anestesiaron con éter para hacerles una incisión a la altura de la tráquea; bajo microscopio se visualizaron las glándulas paratiroides (unas bolitas de color amarillo) y se disectaron cuidadosamente. Estas glándulas se reimplantaron en los músculos del cuello; después se buscó la glándula tiroidea que es una estructura que rodea la tráquea, se disectó cuidando de no dañar los nervios de la laringe, se extirpó y se suturó la herida (14). Este modelo está bien caracterizado (13), por lo que no hay alteraciones en las concentraciones de calcio [ $10.1 \pm 0.7$  mg/dl (normales) y  $9.7 \pm 0.7$  mg/dl (hipotiroides)] y fósforo [ $6.9 \pm 1.1$  mg/dl (normales) y  $6.5 \pm 0.4$  mg/dl (hipotiroides)], debido a la reimplantación de las glándulas paratiroides. Con este procedimiento también se asegura que las hormonas tiroideas disminuyan en la sangre [ $4.20 \pm 0.50$  µg / ml (normales) y  $2.30 \pm 0.03$  µg / ml (hipotiroides)].

### 5.2.4. Isquemia-reperfusión

En este procedimiento primeramente las ratas se anestesiaron con pentobarbital (3.15 mg/Kg, i.p.), se les administró 10 µl de heparina por vía intravenosa y se les mantuvo en un cojín térmico, con el fin mantener la temperatura corporal estable. Después de quince minutos se les practicó una incisión en la línea media abdominal, una vez localizados los intestinos se removieron con cuidado y se taparon con una gasa empapada con solución salina isotónica, para evitar la deshidratación del animal. Después de esto, se removió el riñón derecho, el cual sirvió como valor basal, luego se ubicó el riñón izquierdo y se disectó cuidadosamente la arteria renal, a la cual se le colocó un clip no traumático durante 60 minutos para impedir el paso de la sangre al riñón. Al término del tiempo se liberó el clip. Las ratas se sacrificaron veinticuatro horas después de las cuales se extrajo el riñón y se colocó en una caja Petri fría, para

separarlo en tres partes: la médula interna, la médula externa y la corteza. Este mismo procedimiento se realizó también en las ratas que se sacrificaron a las 48 y 72 horas.

### 5.3. **Métodos empleados**

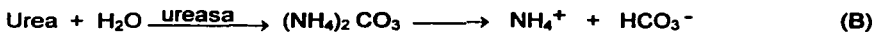
#### 5.3.1. Determinaciones analíticas

##### 5.3.1.1. *Determinaciones bioquímicas (creatinina, BUN y proteínas)*

Las determinaciones de creatinina y nitrógeno de urea se realizaron en equipos semiautomatizados de la marca Beckman Instruments conocidos como analizador 2 de creatinina y un analizador 2 de BUN, respectivamente. La creatinina se determinó a través de la reacción de Jaffé (ecuación A) (22), en dicha reacción la creatinina forma un complejo color anaranjado en presencia del picrato en medio alcalino, este método no necesita de aditivos especiales para mantener la integridad de la muestra, la mayor interferencia que se puede presentar es por la concentración de acetona o de acetoacetato.



El nitrógeno de urea se determinó por medio de un método enzimático que mide la velocidad de aumento de la conductividad que es proporcional a la concentración del carbonato de amoníaco (22) (una especie iónica) en la reacción (ecuación B):



Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el procedimiento según Lowry, el cual se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el reactivo cúprico en medio alcalino. Después se adiciona el reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin) el cual reacciona con los residuos de los aminoácidos aromáticos, principalmente tirosina y triptofano, presentes en el complejo proteína-cobre. Para esta técnica se diluyó el homogenado renal 1:200 (para corteza) y 1:100 (para médula tanto interna como externa), de esta solución se tomaron 200  $\mu\text{l}$  los cuales se mezclaron con

una solución de cincuenta partes de tartrato de sodio (0.02%) y una parte de sulfato de cobre (0.5%) y se agitaron fuertemente. Después se dejó reposar durante diez minutos, al término de este tiempo se le añadió una solución de Folin 1:2 mientras los tubos se agitaron fuertemente y se dejaron reposar por treinta minutos más. Luego se leyó en el espectrofotómetro DU 600 de Beckman Instruments a 660 nm, el valor obtenido se interpoló en una curva de calibración previamente realizada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina.

### 5.3.2. Determinaciones enzimáticas

#### 5.3.2.1. Preparación del homogenado renal para determinar actividad de las enzimas CAT, GPx y SOD

Se pesaron 0.5 g de corteza renal extraída de la rata, y se le agregaron 4.5 ml de un amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7) que contenía Tritón-X al 0.1%, para el caso de la médula externa y de la interna se pesó y añadió la cantidad de amortiguador de fosfatos correspondiente a una dilución 1:10 (32). El tejido se homogenizó con una cuchilla, el homogenado se transfirió a un tubo Eppendorf el cual se centrifugó durante 60 minutos a 14,000 rpm, a una temperatura de 4°C, con el fin de eliminar los componentes más pesados del homogenado. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y de este se tomó el volumen necesario para realizar las determinaciones tanto de la actividad de las enzimas como de la concentración de las proteínas.

#### 5.3.2.2. Actividad de catalasa

La determinación de catalasa se basa en el hecho de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, su sustrato, absorbe a 240 nm. La descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede seguirse directamente por la disminución en la densidad óptica a 240 nm ( $\epsilon_{240} = 0.00394 \pm 0.0002$  litros mol<sup>-1</sup> seg<sup>-1</sup>) y esta reacción de descomposición por catalasa sigue una cinética de primer orden. La diferencia en absorbencia a ( $\Delta A_{240}$ ) por unidad de tiempo es una medida de la actividad de catalasa.

La descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se mide espectrofotométricamente y se calcula la constante de reacción de primer orden ( $k$ ) usando la siguiente fórmula:

$$k = (1/t)(\ln [A_1/A_2]) \quad \text{Las unidades de } k \text{ son litros mol}^{-1} \text{ seg}^{-1} \quad (\text{C})$$

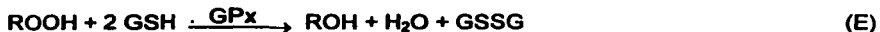
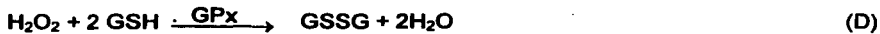
Ya que la energía para la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizado por la catalasa es muy baja (2500 –7100 kJ/mol), hay solo una dependencia ligera de la temperatura ( $Q_{10} = 1.05 - 1.12$ ), por lo que el ensayo se puede realizar a  $20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ . La descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  inicialmente (0-30 segundos) sigue aquella de una reacción de primer orden con concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 0.01 y 0.05 M. Para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo (normalmente 30 segundos) se utilizó una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  relativamente baja (10 mM) puesto que hay una proporcionalidad directa entre la concentración del sustrato y la velocidad de descomposición. La curva de actividad de pH relativa a  $v_0$  (velocidad inicial) tiene un pH óptimo bastante amplio (pH 6.8 – 7.5), por esto se realizaron las mediciones a pH 7.0.

Partiendo del homogenado renal se tomó el volumen necesario para obtener una dilución 1:33 con un amortiguador de fosfatos (10 mM y pH 7) para el caso de corteza, de esta nueva solución se tomaron 25  $\mu\text{l}$ , los cuales se pusieron en una celda de cuarzo la cual se introdujo al espectrofotómetro. Una vez ahí se le agregó el reactivo peróxido de hidrógeno (7.7 mM) y se realizaron un total de tres mediciones a una longitud de onda de 240 nm, se midió inmediatamente, a los 15 y a los 30 segundos. Una vez obtenidas las lecturas se utilizó la ecuación C, además del criterio específico donde se ve la diferencia de absorbencia entre el tiempo uno y el dos, así también la diferencia entre el tiempo dos y el tres, las cuales no deben ser menores de 0.02 ni mayores de 0.2. Para la determinación de la actividad de esta enzima en la médula interna y externa se utilizó una dilución que cumplió con la observación antes mencionada. Los valores de actividad enzimática se corrigieron por los miligramos de proteína que contenía el tejido.

#### 5.3.2.3. *Actividad de glutatión peroxidasa*

La glutatión peroxidasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (ecuación D) o de otros peróxidos orgánicos (ecuación E) a agua utilizando GSH como cofactor.

El glutatión oxidado producido es regenerado nuevamente a GSH por la enzima glutatión reductasa (ecuación F) la cual utiliza NADPH como cofactor. El NADPH, pero no su forma oxidada (NADP<sup>+</sup>) absorbe a 340 nm. El ensayo se basa en la disminución de la densidad óptica a 340 nm producido por el consumo de NADPH en la reacción de regeneración de GSH.



Para medir la actividad de la glutatión peroxidasa se utilizó el homogenado renal diluido 1:10 con un amortiguador de fosfatos (5.0 mM, pH 7), y de esta dilución se transfirieron 100 µl a un tubo el cual se incubó a temperatura ambiente con 800 µl de una solución que contenía azida de sodio, NADPH, glutatión reducido y glutatión reductasa (1 unidad de glutatión reductasa por mililitro) disueltos en el amortiguador de fosfatos (50 mM pH 7). Esta incubación duró cinco minutos, después de los cuales se agregaron 100 µl de peróxido de hidrógeno en una celda de cuarzo y se introdujo al espectrofotómetro junto con todo el contenido del tubo de incubación. La celda se leyó a 340 nm, con esto se midió la desaparición del NADPH, la cual es proporcional a la actividad de la enzima. Los cálculos para reportar la actividad de esta enzima se hicieron utilizando un blanco (este contenía lo mismo que la muestra excepto la muestra misma), se obtuvo un promedio de las diferencias entre las absorbencias a diferentes tiempos. El promedio obtenido es tanto del blanco como de las muestras, el primero de estos promedios se le resta al promedio obtenido a partir de cada una de las muestras, el resultado obtenido se multiplica por 0.16 (el cual se obtiene al considerar el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a la longitud de onda leída), obteniéndose las unidades de glutatión peroxidasa las cuales se dividieron entre los miligramos de proteína contenidos en la celda. Una unidad de glutatión peroxidasa se define como la cantidad de enzima que oxida 1 µmol de NADPH / minuto (16).

### 5.3.2.4. Actividad de superóxido dismutasa total

La mezcla de reacción contiene un sistema generador de iones superóxido formado por la xantina, la xantina oxidasa y un sistema detector de los iones superóxido constituido por el nitroazul de tetrazolio (Figura 5.1) que cambia de color, al ser reducido (Figura 5.2) por los iones superóxido. La enzima superóxido dismutasa, presente en las muestras, metaboliza los iones superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa y de esta manera, compite con el NBT por estos iones (Figura 5.3 y 5.4). La actividad de la superóxido dismutasa es directamente proporcional al grado de inhibición del NBT, es decir la intensidad del color es inversamente proporcional a la actividad de la enzima. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la reducción del NBT (25).

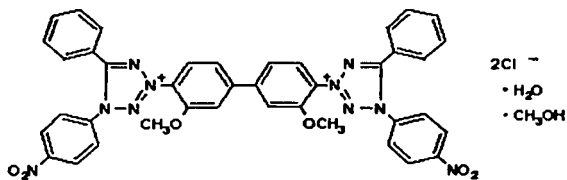


Figura 5.1. Estructura del nitroazul de tetrazolio (NBT).

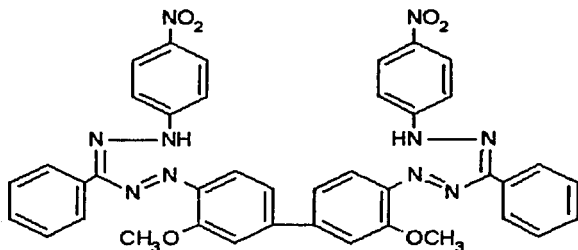


Figura 5.2. Estructura del NBT reducido o formazán.





Figura 5.3. Principio de la determinación de la actividad de SOD

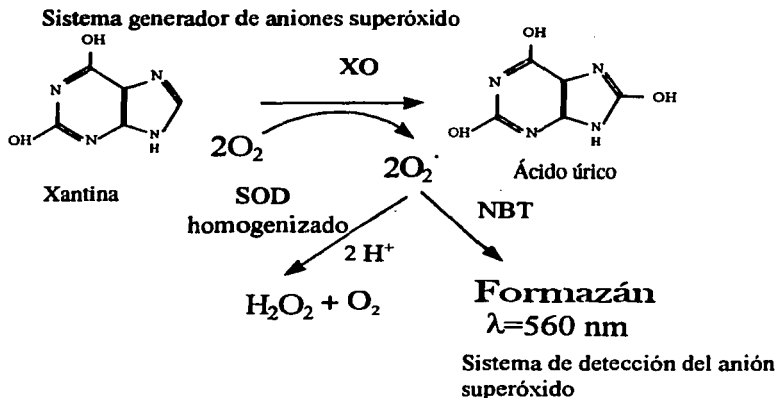


Figura 5.4. Fundamento de la determinación de la enzima superóxido dismutasa (20). SOD= superóxido dismutasa, XO= xantina oxidasa.

Esta técnica mide las dos isomorfas de la enzima; es decir, tanto a la citosólica (Cu-Zn SOD) como a la mitocondrial (Mn-SOD). Para medir estas enzimas se incubó el homogenado renal diluido 1:100 (para determinar la actividad en la corteza y para el caso de la médula externa se empleó una dilución 1:50) con una mezcla de reacción que contenía xantina, EDTA, NBT, carbonato de sodio y albúmina sérica bovina. A 1.63 ml de esta mezcla, contenidos en un tubo de ensayo, se les agregó 330  $\mu$ l del homogenado y 33  $\mu$ l del sustrato xantina oxidasa (adicionándose a intervalos de quince o veinte segundos), a otros tubos se les agregaron los mismos reactivos exceptuando la xantina oxidasa, siendo estos el blanco de cada muestra y a una tercera serie de tubos

se les agregó la mezcla pero no el homogenado renal, de tal manera que sirvieran como blanco de comparación. A esta serie de tubos se le incubó por un lapso de quince minutos a 27°C, al término del tiempo se les adicionaron 660 µl de CuCl<sub>2</sub> para detener la reacción y se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm. Finalmente se corrigieron por los miligramos de proteínas contenidos en el ensayo. Esta enzima no se determinó en la médula interna renal debido a que se tenía muy poca cantidad de muestra.

#### **5.4. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media ± la desviación estándar (DS). Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Prism versión 3.0 (Graph Pad, San Diego CA., USA) mediante ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Bonferroni para verificar si había diferencias entre los dos grupos. La ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Dunnett se utilizó para comparar los diferentes tiempos de reperusión contra el valor basal, tanto en las ratas normales como en las hipotiroideas. Se utilizó la t Student no pareada para comparar los valores basales de las ratas normales y de las ratas hipotiroideas, y para comparar los pesos de las ratas de ambos grupos. En el caso de la médula interna se utilizó la prueba de U de Mann Whitney para comparar los valores basales de ambos grupos, debido a que las varianzas no fueron homogéneas. En todos los casos anteriores se consideró que un resultado era significativamente diferente cuando la  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. *Peso corporal y por ciento de mortalidad*

En la tabla 6.1 podemos observar que los pesos iniciales son homogéneos, lo cual asegura que los resultados encontrados no se deben a diferencias en el peso corporal.

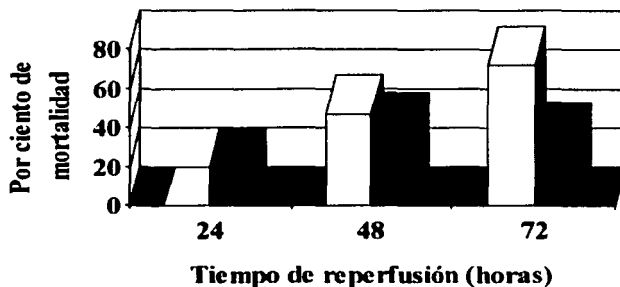
Tabla 6.1. **Peso corporal de las ratas antes de la isquemia.**

| Horas | Normales | Hipotiroides | p  |
|-------|----------|--------------|----|
| 24    | 332 ± 12 | 359 ± 32     | NS |
| 48    | 345 ± 16 | 358 ± 14     | NS |
| 72    | 341 ± 16 | 324 ± 19     | NS |

NS = no significativo

En la gráfica 6.1 y en la tabla 6.2 observamos que el por ciento de mortalidad a las 24 horas en las ratas normales es menor en comparación con las ratas hipotiroides. Sin embargo a medida que el tiempo de reperfusión aumenta el por ciento de mortalidad en las ratas hipotiroides es menor. El pico máximo de mortalidad en las ratas normales se observó a las 72 h y en las ratas hipotiroides se obtuvo a las 48 h.

## Por ciento de mortalidad durante el tiempo de reperfusión



Gráfica 6.1. Curso temporal del por ciento de mortalidad en las ratas normales (□) e hipotiroideas (■).

Tabla 6.2. Por ciento de mortalidad de las ratas durante el tiempo de la reperfusión.

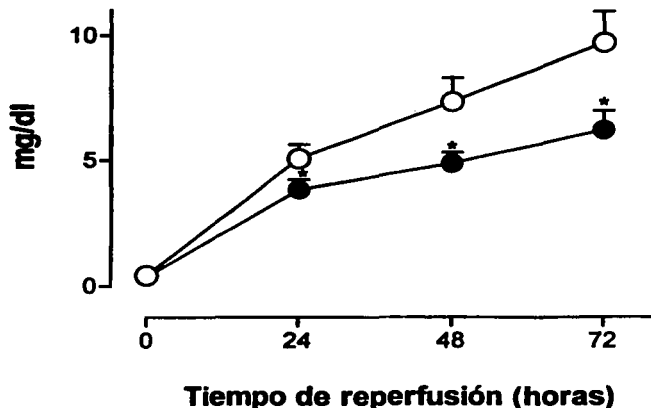
|               | 24 h       | 48 h       | 72 h        |
|---------------|------------|------------|-------------|
| Normales      | 0/8 (0%)   | 8/17 (47%) | 28/39 (72%) |
| Hipotiroideas | 2/10 (20%) | 5/13 (38%) | 5/15 (33%)  |

### 6.2. Creatinina y nitrógeno de urea en sangre

En la gráfica 6.2 y en la tabla 6.3 podemos observar que la creatinina aumenta desde las veinticuatro horas en ambos grupos de ratas, sin embargo, el aumento fue significativamente menor en las ratas hipotiroideas. El aumento a las 24, 48 y 72 h en las ratas normales fue de 11, 16 y 22 veces respectivamente contra el tiempo basal y en las ratas hipotiroideas fue de 10, 12 y 16 veces, respectivamente contra el tiempo

basal. Se observa que la tendencia al aumento persiste aún a las 72 horas. Los valores basales no fueron diferentes entre ambos grupos.

### Efecto de la isquemia y reperfusión sobre la creatinina en suero



Gráfica 6.2. Curso temporal de la concentración de creatinina en suero en las ratas normales (O) e hipotiroideas (●). \*  $p < 0.001$  vs. normales.

Tabla 6.3. Curso temporal de la concentración de creatinina en suero.

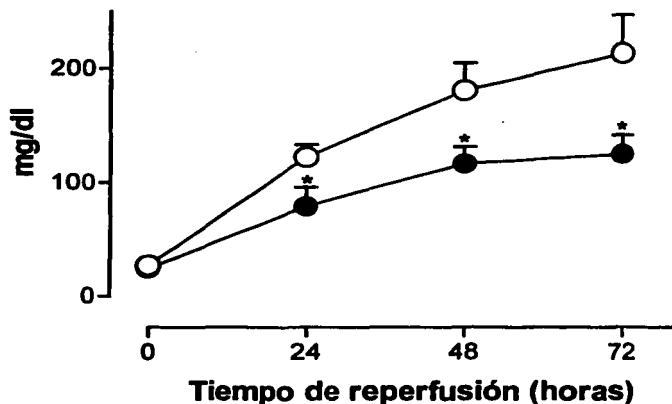
| Grupo         | 0 h (basal)      | 24 h             | 48 h             | 72 h             |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Normales      | 0.45 ± 0.05 (16) | 5.08 ± 0.55 (16) | 7.35 ± 0.96 (14) | 9.72 ± 1.24 (9)  |
| Hipotiroideas | 0.40 ± 0.08 (16) | 3.83 ± 0.41 (16) | 4.88 ± 0.43 (16) | 6.22 ± 0.77 (10) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas

En la gráfica 6.3 y en la tabla 6.4 podemos observar que el nitrógeno de urea aumenta desde las veinticuatro horas tanto en ambos grupos de ratas, siendo el aumento

significativamente menor en las hipotiroideas que en las normales. El aumento en las ratas normales a las 24, 48 y 72 horas fue de 5, 7 y 8 veces, respectivamente contra el tiempo basal y en las ratas hipotiroideas fue de 3, 5, y 5 veces, respectivamente contra el tiempo basal. Observamos que los valores basales no fueron diferentes entre ambos grupos y que el aumento de la concentración de nitrógeno de urea en sangre a las 72 h es menor que en los días previos.

### Efecto de la isquemia y reperfusión sobre el nitrógeno de urea en suero



Gráfica 6.3. Curso temporal de la concentración de nitrógeno de urea en suero en las ratas normales (O) e hipotiroideas (●). \*  $p < 0.001$  vs. normales.

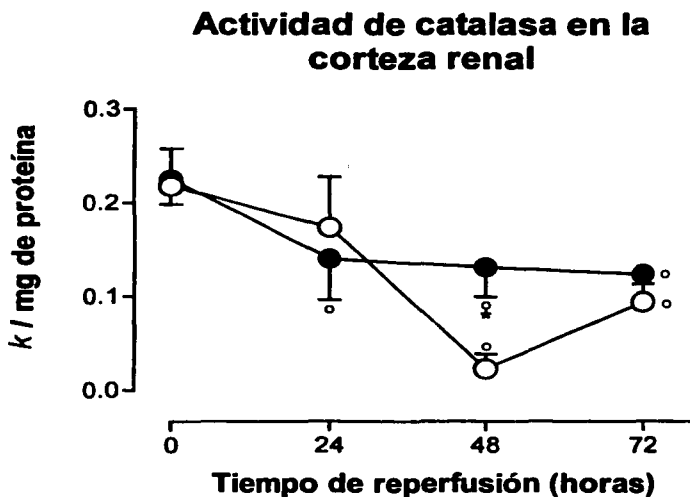
Tabla 6.4. Curso temporal de la concentración de nitrógeno de urea en suero.

| Grupo         | 0 h (basal) | 24 h          | 48 h          | 72 h          |
|---------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| Normales      | 26 ± 2 (16) | 122 ± 11 (16) | 180 ± 24 (15) | 213 ± 34 (10) |
| Hipotiroideas | 23 ± 1 (16) | 78 ± 17 (16)  | 116 ± 15 (16) | 124 ± 17 (10) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas

### 6.3. Actividad de catalasa

En la gráfica 6.4 y en la tabla 6.5 podemos observar que la actividad de catalasa en la corteza renal disminuye en ambos grupos de ratas, obteniéndose un mínimo a las 48 horas para el caso de las normales. Sin embargo, en el caso de las hipotiroideas no existe un mínimo, sino que se observa que la actividad se mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo de reperfusión. Al realizar la prueba estadística de ANOVA de dos vías se encontró que había diferencias significativas entre los dos grupos, específicamente a las 48 horas en donde se observa que la actividad de la enzima en las hipotiroideas está por encima de las normales. Con la prueba de ANOVA de una vía con comparaciones múltiples por el método de Dunnett (GraphPad Prism versión 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), se encontraron disminuciones significativas a las 48 y 72 horas en las ratas normales y a las 24, 48 y 72 horas en las ratas hipotiroideas.



Gráfica 6.4. Curso temporal de la actividad de catalasa en la corteza renal en las ratas normales (○) e hipotiroideas (●). \*  $p < 0.001$  normales vs. hipotiroideas; °  $p < 0.001$  vs. basal.

**Tabla 6.5. Curso temporal de la actividad de catalasa en la corteza renal.**

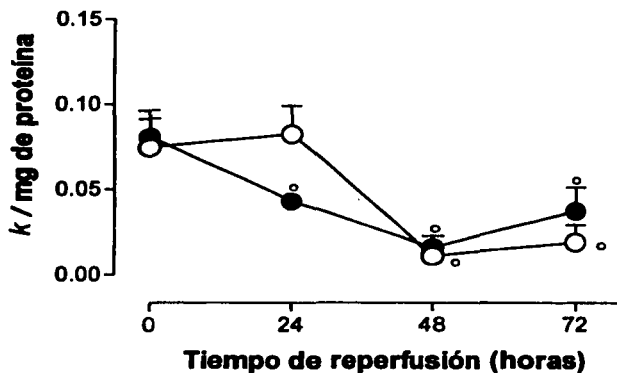
| Grupo        | 0 h (basal)      | 24 h            | 48 h             | 72 h            |
|--------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Normales     | 0.22 ± 0.04 (16) | 0.17 ± 0.05 (5) | 0.022 ± 0.02 (5) | 0.09 ± 0.02 (6) |
| Hipotiroides | 0.22 ± 0.02 (16) | 0.14 ± 0.04 (5) | 0.13 ± 0.03 (5)  | 0.12 ± 0.03 (7) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas

En la gráfica 6.5 y en la tabla 6.6 podemos observar que la actividad de catalasa en la médula externa renal disminuye en el grupo de las ratas hipotiroides obteniéndose un mínimo a las 48 horas, obteniéndose el mismo comportamiento en las el caso de las normales. Al realizar la prueba estadística de ANOVA de dos vías no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos. Con la prueba de ANOVA de una vía con comparaciones múltiples por el método de Dunnett, se observaron diferencias significativas en las ratas normales a las 48 y 72 horas y en las ratas hipotiroides disminución significativa a las 24, 48 y 72 horas.



### Actividad de catalasa en la médula externa renal



Gráfica 6.5. Curso temporal de la actividad de catalasa en la médula externa renal en las ratas normales (O) e hipotiroideas (●). °  $p < 0.001$  vs. basal; ANOVA de dos vías = NS.

Tabla 6.6. Curso temporal de la actividad de catalasa en la médula externa renal.

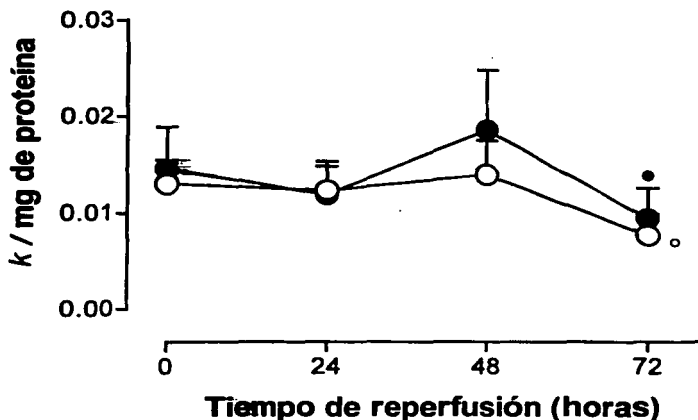
| Grupo         | 0 h (basal)      | 24 h             | 48 h              | 72 h             |
|---------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| Normales      | 0.07 ± 0.02 (16) | 0.08 ± 0.017 (7) | 0.011 ± 0.004 (7) | 0.019 ± 0.01 (8) |
| Hipotiroideas | 0.08 ± 0.02 (16) | 0.04 ± 0.004 (7) | 0.015 ± 0.006 (6) | 0.04 ± 0.01 (7)  |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas.

En la gráfica 6.6 y en la tabla 6.7 se presentan los datos de catalasa en la médula interna renal. La prueba estadística de ANOVA de dos vías reveló que no había diferencias significativas entre los dos grupos. Con la prueba de ANOVA de una vía con

comparaciones múltiples por el método de Dunnett, se encontró una disminución significativa (46%) a las 72 horas en el caso de las ratas normales y en las hipotiroides se encontró una disminución significativa (35%) a las 72 horas del tiempo de reperusión.

### Actividad de catalasa en la médula interna renal



Gráfica 6.6. Curso temporal de la actividad de catalasa en la médula interna renal en las ratas normales (O) e hipotiroides (●). °  $p < 0.001$ , •  $p < 0.05$  vs. basal; ANOVA de dos vías = NS.

Tabla 6.7. Curso temporal de la actividad de catalasa en la médula interna renal.

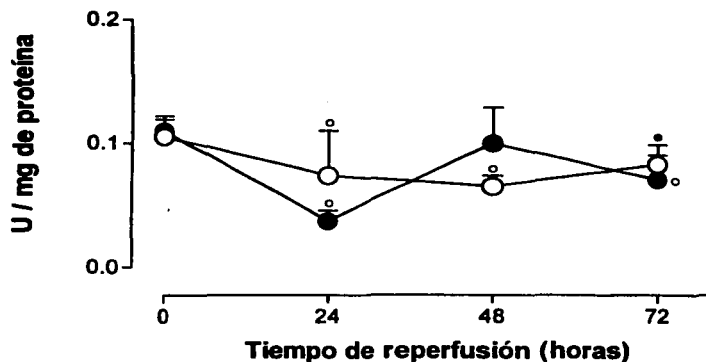
| Grupo        | 0 h (basal)        | 24 h              | 48 h              | 72 h              |
|--------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Normales     | 0.013 ± 0.002 (16) | 0.012 ± 0.003 (7) | 0.014 ± 0.003 (5) | 0.007 ± 0.002 (6) |
| Hipotiroides | 0.014 ± 0.003 (16) | 0.012 ± 0.002 (6) | 0.018 ± 0.006 (5) | 0.009 ± 0.003 (7) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas

#### 6.4. Actividad de glutatión peroxidasa

En la gráfica 6.7 y en la tabla 6.8 se presentan los datos de glutatión peroxidasa en la corteza renal. El ANOVA de dos vías reveló que no había diferencias significativas entre los dos grupos. Con la prueba de ANOVA de una vía con comparaciones múltiples por el método de Dunnett se encontró una disminución significativa a las 24 h (30%), 48 h (42%) y 72 h (22%) en el caso de las ratas normales y a las 24 h (66%) y 72 h (36%) en el caso de las hipotiroideas.

#### Actividad de glutatión peroxidasa en la corteza renal



Gráfica 6.7. Curso temporal de la actividad de glutatión peroxidasa en la corteza renal en las ratas normales (○) e hipotiroideas (●). ° p < 0.001, \* p < 0.05 vs. basal; ANOVA de dos vías = NS.

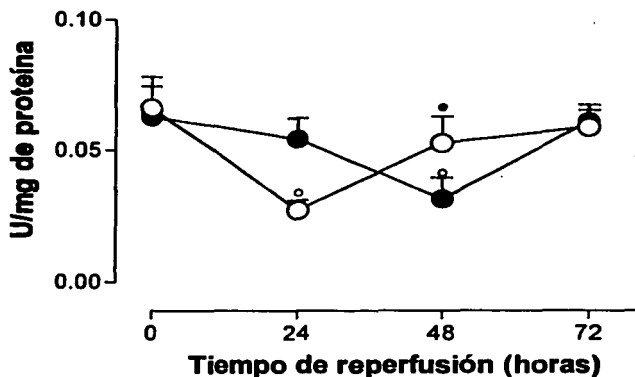
Tabla 6.8. Curso temporal de la actividad de glutatión peroxidasa en la corteza renal.

| Grupo         | 0 h (basal)      | 24 h            | 48 h            | 72 h            |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Normales      | 0.10 ± 0.01 (16) | 0.07 ± 0.03 (7) | 0.07 ± 0.01 (5) | 0.08 ± 0.02 (8) |
| Hipotiroideas | 0.11 ± 0.01 (16) | 0.04 ± 0.01 (8) | 0.10 ± 0.03 (5) | 0.07 ± 0.02 (7) |

Datos: media ± DS. ( ) = número de ratas

En la gráfica 6.8 y en la tabla 6.9 se presentan los datos de glutatión peroxidasa en la médula externa renal. Al realizar la prueba estadística de ANOVA de dos vías se encontró que no había diferencias significativas entre los dos grupos. La prueba de ANOVA de una vía reveló una disminución significativa a las 24h (59%) y 48h (20%) en las ratas normales y a las 48h (50%) en el caso de las hipotiroideas.

### Actividad de glutatión peroxidasa en la médula externa renal



Gráfica 6.8. Curso temporal de la actividad de glutatión peroxidasa en la médula externa renal en las ratas normales (O) e hipotiroideas (●). ° p< 0.001, • p<0.05 vs. basal; ANOVA de dos vías = NS.

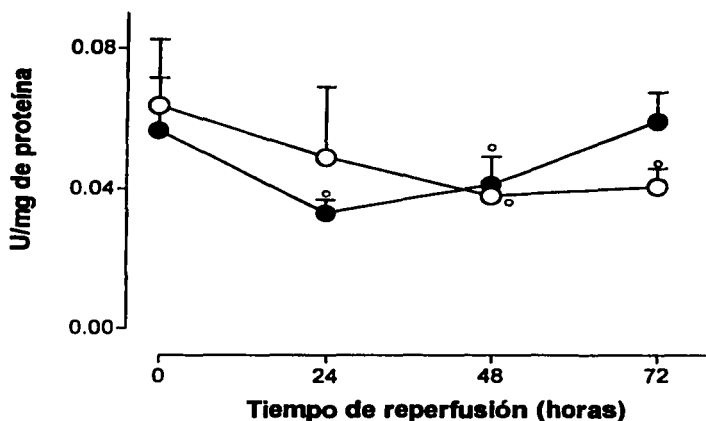
Tabla 6.9. Curso temporal de la actividad de glutatión peroxidasa en la médula externa renal.

| Grupo         | 0 h (basal)      | 24 h             | 48 h            | 72 h             |
|---------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| Normales      | 0.07 ± 0.01 (16) | 0.03 ± 0.003 (7) | 0.05 ± 0.01 (6) | 0.06 ± 0.006 (8) |
| Hipotiroideas | 0.06 ± 0.01 (16) | 0.05 ± 0.007 (8) | 0.03 ± 0.01 (8) | 0.06 ± 0.006 (7) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas

En la gráfica 6.9 y en la tabla 6.10 podemos observar que la actividad de glutatión peroxidasa en la médula interna renal en el caso de las ratas hipotiroideas tiene un mínimo a las 24 horas y en el caso de las normales tiene un mínimo no tan marcado a las 48 horas. Al realizar la prueba estadística de ANOVA de dos vías se encontró que no había diferencias significativas entre los dos grupos. Con la prueba de ANOVA de una vía con comparaciones múltiples por el método de Dunnett, se observó una disminución significativa a las 48 h (40%) y 72 h (37%) en el caso de las ratas normales y a las 24 h (42%) y 48 h (27%) en el caso de las hipotiroideas.

### Actividad de glutatión peroxidasa en la médula interna renal



Gráfica 6.9. Curso temporal de la actividad de glutatión peroxidasa en la médula interna renal en las ratas normales (O) e hipotiroideas (●). °  $p < 0.001$  vs. basal; ANOVA de dos vías = NS.

Tabla 6.10. Curso temporal de la actividad de glutatión peroxidasa en la médula interna renal.

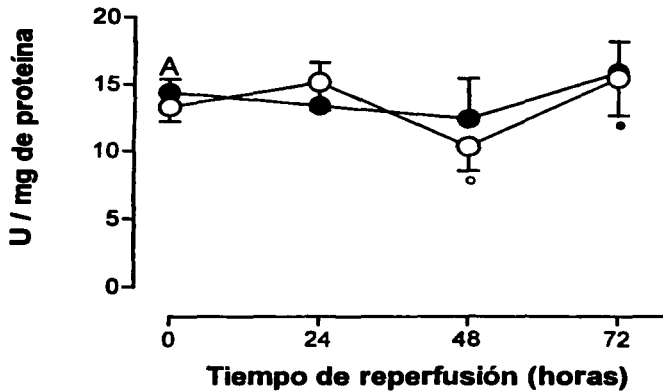
| Grupo        | 0 h (basal)      | 24 h             | 48 h             | 72 h             |
|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Normales     | 0.06 ± 0.02 (16) | 0.05 ± 0.020 (6) | 0.04 ± 0.004 (7) | 0.04 ± 0.005 (7) |
| Hipotiroides | 0.05 ± 0.01 (16) | 0.03 ± 0.003 (8) | 0.04 ± 0.008 (8) | 0.06 ± 0.008 (7) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas

### 6.5. *Actividad de superóxido dismutasa*

En la gráfica 6.10 y en la tabla 6.11 podemos observar que la actividad de superóxido dismutasa en la corteza renal permanece constante a lo largo del tiempo de reperusión en las ratas hipotiroides. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos usando el ANOVA de dos vías. Con la prueba de ANOVA de una vía con comparaciones múltiples por el método de Dunnett, se observó una disminución significativa a las 48 h (22%) y un aumento significativo a las 72 h (116%) en el caso de las ratas normales y no se encontraron diferencias significativas en el caso de las ratas hipotiroides. Los valores basales de las ratas hipotiroides fueron significativamente más altos que los de las ratas normales en un 9.2%.

## Actividad de superóxido dismutasa en la corteza renal



Gráfica 6.10. Curso temporal de la actividad de superóxido dismutasa en la corteza renal en las ratas normales (O) e hipotiroideas (●). °  $p < 0.001$ , •  $p < 0.05$  vs. basal; A  $p < 0.05$  vs. basal normales; ANOVA de dos vías = NS.

Tabla 6.11. Curso temporal de la actividad de superóxido dismutasa en la corteza renal.

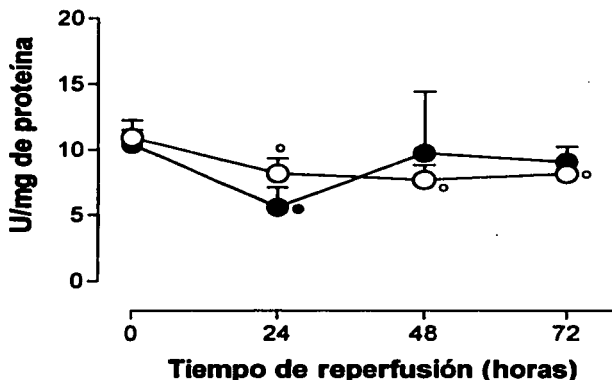
| Grupo         | 0 h (basal)     | 24 h           | 48 h           | 72 h           |
|---------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Normales      | 13.3 ± 1.0 (16) | 15.1 ± 2.1 (7) | 10.3 ± 1.8 (7) | 15.4 ± 2.8 (7) |
| Hipotiroideas | 14.4 ± 1.0 (16) | 13.4 ± 3.2 (6) | 12.4 ± 3.0 (7) | 15.8 ± 2.3 (7) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas

En la gráfica 6.11 y en la tabla 6.12 se presentan los datos de la actividad de la superóxido dismutasa en la médula externa renal. Al realizar la prueba estadística de ANOVA de dos vías se encontró que no había diferencias significativas entre los dos

grupos. La prueba de ANOVA de una vía reveló una disminución significativa a las 24 h (25%), 48 h (30%) y 72 h (72%) en el caso de las ratas normales y a las 24 h (46%) en el caso de las ratas hipotiroideas.

### Actividad de superóxido dismutasa en médula externa renal



Gráfica 6.11. Curso temporal de la actividad de superóxido dismutasa en la médula externa renal en las ratas normales (○) e hipotiroideas (●). ° p < 0.001, • p < 0.05 vs. basal; ANOVA de dos vías = NS.

Tabla 6.12. Curso temporal de la actividad de superóxido dismutasa en la médula externa renal.

| Grupo         | 0 h (basal)     | 24 h          | 48 h          | 72 h          |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| Normales      | 10.9 ± 1.3 (16) | 8.2 ± 1.2 (8) | 7.7 ± 1.2 (7) | 8.1 ± 0.9 (7) |
| Hipotiroideas | 10.4 ± 1.1 (16) | 5.6 ± 1.5 (8) | 9.7 ± 4.7 (8) | 9.0 ± 1.2 (7) |

Datos: media ± DS ( ) = número de ratas



## 7. RESUMEN DE RESULTADOS

Los resultados encontrados están resumidos en las tablas 7.1 y 7.2.

El por ciento de mortalidad en las ratas hipotiroideas se mantiene relativamente constante (20 a 38%) durante el tiempo de reperfusión, lo contrario sucede con las ratas normales, las que tienen su máximo a las 72 horas (72%).

En la tabla 7.1 observamos el comportamiento de la creatinina y el nitrógeno de urea en las ratas de ambos grupos, resaltando dos aspectos: (i) el aumento de creatinina en las ratas normales es mayor que en las ratas hipotiroideas, en ambos casos se observa que la tendencia se mantiene a las 72 horas; y (ii) el aumento de nitrógeno de urea en las ratas normales es mayor que en las ratas hipotiroideas; se observa una tendencia al aumento sólo en las ratas normales.

Tabla 7.1. Número de veces que se incrementa la concentración de creatinina y nitrógeno de urea con respecto al valor basal.

|                   |               | 24 h | 48 h | 72 h |
|-------------------|---------------|------|------|------|
| <b>Creatinina</b> | Normales      | 11   | 16   | 22   |
|                   | Hipotiroideas | 10   | 12   | 16   |
| <b>BUN</b>        | Normales      | 5    | 7    | 8    |
|                   | Hipotiroideas | 3    | 5    | 5    |

En la tabla 7.2 observamos que la actividad de todas las enzimas disminuye o no cambian al respecto de su valor basal.

La disminución en la actividad de la enzima catalasa a las 48 h en corteza renal es mayor en las ratas normales que en las hipotiroideas. También se observa que la

enzima que no se altera en la corteza renal de las ratas hipotiroideas es la superóxido dismutasa.

La región del riñón que se altera menos, en las primeras 48 horas de reperfusión, es la médula interna, ya que no se observan cambios en la actividad de catalasa.

Vemos que la actividad de las enzimas en las ratas normales no tiende a recuperarse a las 72 horas, aspecto que se observa solo en dos de ocho casos y en uno es al revés. También podemos ver que a este mismo tiempo, la actividad de las enzimas antioxidantes disminuye menos en las ratas hipotiroideas, lo cual se cumple en cinco de los ocho casos.

Tabla 7.2. Efecto de las enzimas antioxidantes después de la isquemia y reperfusión en el riñón de las ratas normales e hipotiroideas.

| Región de riñón                   | Catalasa<br>(% de disminución de su actividad) |          |          | Glutatión peroxidasa<br>(% de disminución de su actividad) |          |          | Superóxido dismutasa<br>(% de disminución de su actividad) |          |           |
|-----------------------------------|--|----------|----------|--|----------|----------|--|----------|-----------|
|                                   | 24 h   | 48 h     | 72 h     | 24 h   | 48 h     | 72 h     | 24 h   | 48 h     | 72 h      |
| <b>Corteza</b><br>Normales        | =  | ↓<br>90% | ↓<br>57% | ↓<br>30%   | ↓<br>42% | ↓<br>22% | =  | ↓<br>22% | ↑<br>116% |
|                                   | ↓<br>38%                                       | ↓<br>42% | ↓<br>45% | ↓<br>66%   | =        | ↓<br>36% | =  | =        | =         |
| <b>Médula externa</b><br>Normales | =  | ↓<br>85% | ↓<br>75% | ↓<br>59%   | ↓<br>20% | =        | ↓<br>25%   | ↓<br>30% | ↓<br>72%  |
|                                   | ↓<br>49%                                       | ↓<br>81% | ↓<br>56% | =  | ↓<br>50% | =        | ↓<br>46%   | =        | =         |
| <b>Médula interna</b><br>Normales | =  | =        | ↓<br>46% | =  | ↓<br>40% | ↓<br>37% |  |          |           |
|                                   | =  | =        | ↓<br>35% | ↓<br>42%   | ↓<br>27% | =        |  |          |           |

## 8. DISCUSIÓN

Analizando los datos encontrados, podemos afirmar que la IRA está bien caracterizada por dos parámetros indicadores de daño renal (2), (i) el valor de creatinina en suero ya que se filtra libremente a través del glomérulo, no se reabsorbe, no se secreta, no se metaboliza y no depende de la alimentación, solo depende de la masa muscular del animal; (ii) el nitrógeno de urea que se filtra libremente por el glomérulo y casi no se reabsorbe; sin embargo tiene el inconveniente de que es dependiente de la dieta.

La protección parcial observada en las ratas hipotiroideas se hace evidente por los valores de creatinina, BUN y por ciento de mortalidad, pero no por las actividades de las enzimas antioxidantes. Sin embargo, se puede asegurar con certeza que no hubo otros factores, además de la I/R y el hipotiroidismo, que afectaran el experimento ya que la tiroidectomía con la reimplantación de la paratiroides asegura que no hay hipocalcemia e hipofosfatemia, hecho demostrado al no encontrar diferencias en los niveles séricos de calcio y fosfato antes y después de la cirugía (15). Uno de los efectos que pudo causar la tiroidectomía es el de obtener valores basales de GPx y SOD en médula renal ligeramente por debajo de los normales, lo cual podría ser el resultado de un decremento en el nivel basal metabólico del riñón (3).

Podemos observar que a medida que pasa el tiempo las actividades enzimáticas de SOD y GPx en las diferentes partes del riñón, tienden a ser iguales al valor basal, de manera que es posible que el tiempo de reperfusión empleado no sea el suficiente como para accionar o inducir la protección (52), ya que se ha visto que la inducción de las enzimas antioxidantes está dada a nivel de transcripción sin embargo el balance entre la producción y la degradación de las enzimas antioxidantes pudiera ser negativo debido a la alta demanda de las enzimas por parte de las ERO (52).

También consideramos que el tiempo de isquemia fue demasiado, lo que pudiera estar enmascarando la protección debido a las enzimas antioxidantes, pudiendo tener estas una menor actividad debido a: (i) la inactivación por una sobreproducción de los sustratos (regulación negativa); o (ii) la inactivación por modificaciones de las proteínas, dentro de las cuales se encuentran la carboxilación, nitración u oxidación del sitio activo de la enzima (7). El enmascaramiento de la actividad de las enzimas antioxidantes se ve reforzado por los valores de creatinina y BUN los cuales no parecen disminuir con el tiempo dando indicios de que el daño va en aumento, con respecto al tiempo de

isquemia se ha observado que con tan sólo treinta minutos hay un daño renal (10). Aunado a este hecho se ha observado que con un tiempo prolongado de isquemia favorece la migración de los neutrófilos hacia la zona de la isquemia, así como una sobre expresión de las moléculas de adhesión (ICAM-1) (40), la cual es una citocina inducible que se expresa en la superficie del endotelio de los vasos capilares cercanos a la lesión, esta expresión es regulada por el factor de necrosis tumoral (51), siendo que la molécula de ICAM-1 tiene una regulación positiva en la región glomerular durante la isquemia de 60 min y reperusión de 120 min. (40). Además de esta citocina intervienen otros mediadores de la inflamación los cuales ocasionan la llegada de leucocitos activados, que pueden verter al medio el anión superóxido y el óxido nítrico, precursores del radical hidroxilo y un radical de nitrógeno. De modo que la presencia de las células o mediadores de la inflamación exacerban el daño ya generado por las ERO. Consideramos que para analizar más el daño generado durante este proceso se debería tener un marcador de estrés oxidativo, medir la cantidad de radicales libres y la expresión de moléculas del sistema inmune.

En la médula interna renal así como en la médula externa renal la actividad de glutatión peroxidasa tiende a disminuir menos en las ratas hipotiroideas, debido a que la producción de malondialdehído, producto de la lipoperoxidación, es menor en estas ratas (30). Cualquier disminución en la SOD ocasiona mayor susceptibilidad hacia el daño oxidativo en los tejidos (40), tal es el caso de la médula externa renal en donde se observa que las ratas normales tienen una tendencia hacia la disminución de la actividad de esta enzima, motivo por el cual el daño pudo exacerbarse más en las ratas normales.

Es posible que la disminución del consumo de oxígeno en las ratas hipotiroideas dé como resultado una menor producción de radicales libres en el estado basal (30) generando con ello una menor participación de las enzimas antioxidantes, como lo demuestran los resultados obtenidos de la actividad de catalasa en la corteza renal y en SOD donde se observa una tendencia lineal a lo largo del tiempo en la corteza renal.

Por otro lado debido a que la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  está disminuida, tanto en la I/R como en el hipotiroidismo, esto también podría disminuir el consumo de oxígeno (53) y, por lo tanto, la generación de ERO, aspecto que se observa en las ratas hipotiroideas ya que la mayoría de las actividades enzimáticas logran reestablecerse antes que las actividades enzimáticas de las ratas normales.

La disminución de la concentración renal de adenosina en las ratas hipotiroidicas (13) también podría explicar la menor producción de ERO ante la I/R en estas ratas.

Dobashi *et al.* (10) encontraron que la disminución inicial en la actividad de todas las enzimas antioxidantes estudiadas, después de la I/R, se debe tanto a la disminución en la cantidad de proteínas, como a la inactivación de estas enzimas.

Se ha propuesto que la protección en el hipotiroidismo está dada por el sistema de monooxigenasas del P-450 (50) además de que hay reportes en donde se asegura que el NO contribuye más que las ERO en el daño inducido por isquemia y reperusión (40), consideramos que si este hecho es así las enzimas antioxidantes encargadas de detoxificar a las ERO no estarían tan involucradas en este proceso.

## **9. CONCLUSIONES**

**Se logró caracterizar al sistema antioxidante enzimático en las diferentes partes del riñón de las ratas normales e hipotiroideas sometidas a un reto oxidativo.**

**No obstante que se obtuvo protección parcial en las ratas hipotiroideas en contra del daño renal inducido por I/R no se pudo probar de manera consistente que ésta se debiera a diferencias en la actividad basal o a una regulación diferencial de todas las enzimas estudiadas. La protección parcial se puede atribuir a una menor disminución en la actividad de catalasa en la corteza renal de las ratas hipotiroideas a las 48 h y a la ausencia de cambios de la actividad de SOD en la corteza renal de estas mismas ratas.**

## 10. PERSPECTIVAS

En este proyecto sólo se está midiendo una parte del sistema antioxidante de la célula, faltaría averiguar que está sucediendo con el sistema de tiorredoxina-peroxirredoxinas que incluye a la tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y a las peroxiirredoxinas (Figura 10.1). Este es un sistema que metaboliza el peróxido de hidrógeno, análogo al del glutatión-glutatión peroxidasa. También se podrían valorar los niveles antioxidantes no enzimáticos como es la vitamina E (28) y la cantidad de radicales libres emitida, incluyendo a los radicales de nitrógeno (48). Sería también recomendable que se midieran sustancias como son el ICAM-1, por medio de inmunohistoquímica (40), y el factor de necrosis tumoral, por medio de la determinación de su mRNA (51). Se podría también medir el nivel transcripcional y de traducción ya que bajo estrés oxidativo las enzimas antioxidantes son reguladas a este nivel (41). Los ensayos recomendados serían tanto en el estado basal como en el reto oxidativo de I/R.

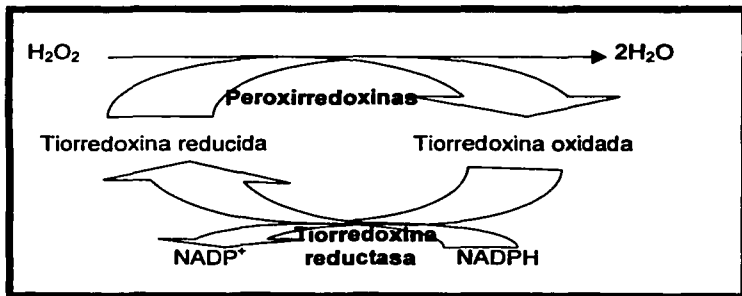


Figura 10.1 Sistema de tiorredoxina-peroxirredoxinas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, Megata Y, Kato K. *Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism*. *Endocrinology* 1987; 121, 2112–2118.
2. Brady HR, Brenner BM, Clarkson MR, Lieberthal W. Acute renal failure en: *The kidney*. (Brenner BM, AM, DM, FRCP, eds.) 6ª ed., WB Sauders Co., vol. 1, 2000 (USA), capítulo 28.
3. Capasso G, De Santo NG. *Thyroid hormones and renal transport; cellular and biochemical aspects*. *Kidney Int* 1987; 32, 443–451.
4. Capasso G, De Tommaso G, Pica A, Anastasio P, Capasso J, Kinne R, De Santo NG. *Effects of thyroid hormones on heart and kidney functions*. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25, 56–64.
5. Chávez E, Franco M, Reyes-Vivas H, Zazueta C, Ramirez J, Carillo R. *Hypothyroidism renders liver mitochondria resistant on the opening of membrane permeability transition pore*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1407, 243–248.
6. Chen YF, Li PL, Zou AP. *Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281, R1808-R1816.
7. Conti M, Eschwege P, Ahmed M, Paradis V, Droupy S, Loric S, Bedossa P, Charpentier B, Legrand A, Benoit G. *Antioxidant enzymatic activities and renal warm ischemia: correlation with duration of ischemia*. *Transplant Proc* 2000; 32, 2740–2741.
8. Davis RG, Madsen KM, Fregly MJ, Tisher CC. *Kidney structure in hypothyroidism*. *Am J Pathol* 1983; 113, 41–49.
9. De Groot LJ, Hennemann G. *The thyroid and its diseases*; Endocrine Education Inc., (<http://www.thyroidmanager.org/thyroidbook.htm>), 2002, capítulo 1, 2, 3 y 5.
10. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. *Kidney ischemia – reperfusion: modulation of antioxidant defenses*. *Mol Cell Biochem* 2000; 205, 1–11.
11. Falk SA, Buriv V, Hammond WS. *Serial dynamics in thyroidectomized rats with remnant kidneys*. *Am J Kidney Dis* 1991; 2, 218–227.



12. Fernández V, Barrientos X, Kipreos K, Valenzuela A, Videla LA. *Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation.* *Endocrinology* 1985; 117, 496–501.
13. Franco M, Bobadilla NA, Suárez J, Tapia E, Sánchez L, Herrera-Acosta J. *Participation of adenosine in the renal hemodynamic abnormalities of hypothyroidism.* *Am J Physiol* 1996; F254-F262.
14. Franco M, Tapia E, Martínez F, Davila Ma. E, Grimaldo JI, Medina K, Herrera-Acosta J. *Adenosine regulates renal nitric oxide production in hypothyroid rats.* *J Am Soc Nephrol* 1999; 10, 1681-1688.
15. Gillum DM, Falk SA, Hammond WS, Conger JD. *Glomerular dynamics in the hypothyroid rat and the role of the renin-angiotensin system.* *Am J Physiol* 1987; F170-F179.
16. Granados-Silvestre A. *Efecto del ajo en polvo sobre el síndrome nefrótico y la hipertensión.* Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química UNAM, 1999.
17. Guemouri L, Artur Y, Herberth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. *Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood.* *Clin Chem* 1991; 37, 1932–1937.
18. Guerrero A, Pamplona R, Portero-Otin M, Barja G, López-Torres M. *Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver.* *Free Radic Biol Med* 1999; 26, 73-80.
19. Gwinner W, Deters-Evers U, Blandes RP, Kubat B, Koch KM, Pape M, Olbricht CJ. *Antioxidant-oxidant balance in glomerulus and proximal tubule of the rat kidney.* *J Physiol* 1998; 509, 559-606.
20. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine.* 3<sup>a</sup> ed., Oxford University Press, 2001 (UK), p 105-118, 134-138, 143-146, 641-647.
21. Heufelder AF, Wenzel BE, Bahn RS. *Methimazole and propylthiouracil inhibit the oxygen free radical – induced expression of a 72 kilodalton heat shock protein in Graves' retroocular fibroblasts.* *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74, 737–742.
22. Kaplan A, Rhona J, Kent EO. *Clinical Chemistry; interpretation and techniques.* 4<sup>a</sup> ed., Williams & Wilkins, 1995 (USA), p 109-110, 351-356, 380-387.

23. Kaplan L, Pesce AJ. *Clinical Chemistry; theory, analysis and correlation*. 3ª ed., Ed. Mosby, 1996 (USA), capítulo 44.
24. Krishan P, Sharma A, Singh M. *Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on ischemia – reperfusion – induced renal injury in rats*. *Pharmacol Res* 1998; 37, 23–29.
25. Maldonado J. PD. *Nefrotoxicidad por gentamicina. Efecto protector del ajo y su relación con la superóxido dismutasa*. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química UNAM, 2000.
26. Mano T, Sinohara R, Sawai Y, Oda N, Nishida Y, Mokuno T, Asano K, Ito Y, Kotake M, Hamada M, Nakai A, Nagasaka A. *Changes in lipid peroxidation and free radical scavengers in the brain of hyper and hypothyroid aged rats*. *J Endocrinol* 1995; 147, 361-365.
27. Montagna G, Hofer CG, Torres M. *Impairment of cellular redox status and membrane protein activities in kidneys from rats with ischemic acute renal failure*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1407, 99–108.
28. Nath KA, Norby SM. *Reactive oxygen species and acute renal failure*. *Am J Med* 2000; 109, 65-678.
29. Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH. *Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons*. *Am J Physiol* 1990; 258, F1354–F1362.
30. Paller MS. *Hypothyroidism protects against free radical damage in ischemia acute renal failure*. *Kidney Int* 1986; 29, 1162-1166.
31. Pedraza-Chaverrí 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.
32. Pedraza-Chaverrí J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Ibarra-Rubio ME. *Post-transcriptional control of catalase expression in garlic treated rats*. *Mol Cell Biochem* 2001; 216, 9-19.
33. Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME. *Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes*. *Free Radic Biol Med* 2000; 29, 602-611.

34. Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Hernandez-Pando R. *Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis*. Mol Cell Biochem 2000; 211, 69-77.
35. Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Bobadilla N. *Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the spin-trapping agent  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN)*. Ren Fail 1992; 14, 467-471.
36. Pereira B, Rosa LF, Safi DA, Bechara EJ, Curi R. *Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat macrophages*. Biochem Pharmacol 1995; 50, 2093-2098.
37. Prem P, Parihar MS, Malini L, Pradeep KG. *Starvation induces hypothyroidism involves perturbations in thyroid superoxide – SOD system in pigeons*. Bioch Mol Biol Int 1998; 45, 73-83.
38. Racusen LC. The morphological basis of acute renal failure en: *Acute Renal Failure; a companion to Brenner & Rector's the Kidney*. (Molitoris BA & Finn WF, eds.) WB Saunders Co., USA, 2001 p 1-12.
39. Rodriguez-Pierce M, Sosenko IR, Whitney P, Frank L. *Propylthiouracil treatment decreases the susceptibility to oxygen radical – induced lung damage in newborn rats exposed to prolonged hyperoxia*. Pediatr Res 1994; 35, 530-535.
40. Seth P, Kumari R, Madhavan S, Singh AK, Mani H, Banaudha KK, Sharma SC, Kulshreshtha DK, Maheshwari RK. *Prevention of renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats by picroliv*. Biochem Pharmacol 2000; 59, 1315-1322.
41. 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.
42. Sodeman & Sodeman; *Pathologic physiology; Mechanisms of disease*; WB Saunders Co., 1974 (USA), p 879-880.
43. Sosenko IR, Frank L. *Thyroid hormone depresses antioxidant enzyme maturation in fetal rat lung*. Am J Physiol 1987; R592-R598.
44. Sosenko IR, Frank L. *Thyroid inhibition and developmental increases in fetal rat lung antioxidant enzyme*. Am J Physiol 1989; 147, L94-L99.
45. Sugawara M, Kita T, Lee ED, Takamatsu J, Hagen GA, Kuma K, Medeiros-Neto GA. *Deficiency of superoxide dismutase in endemic goiter tissue*. J Clin Endocrinol Metab 1988; 67, 1156-1161.

46. Swaroop A, Ramasarma T. *Heat exposure and hypothyroid conditions decrease hydrogen peroxide generation in liver mitochondria.* Biochem J 1985; 225, 403–408.
47. Troncoso P, Smok G, Videla LA. *Potential of ischemia – reperfusion liver injury of hyperthyroidism in the rat.* Free Radic Biol Med 1997; 23, 19-25.
48. Ueda N, Mayeux PR, Baliga R, Shah SV. Oxidant mechanism in acute renal failure en: *Acute Renal Failure; a companion to Brenner & Rector's the Kidney.* (Molitoris BA & Finn WF, eds.) WB Saunders Co., USA, 2001 p 60-77.
49. Varghese S, Shameena B, Oommen OV. *Thyroid hormones regulates lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in Anabas testudineus (Bloch).* Comp Biochem Physiol 2001; 128, 165-171.
50. Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T. *Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissues.* J Endocrinol 1997; 155, 151–157.
51. Yin M, Wheeler MD, Connor HD, Zhong Z, Bunzendahl H, Dikalova A, Samulski RJ, Schoonhoven R, Mason RP, Swenberg JA, Thurman RG. *Cu/Zn-superoxide dismutase gene attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat kidney.* J Am Soc Nephrol 2001; 12, 2691-2700.
52. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene LH, Burr IM, Ichikawa I. *Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury.* Kidney Int 1990; 38, 282–288.
53. Zager RA, Burkhart K. *Decreased expression of mitochondrial – derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroxyl radical in cytoresistant proximal tubules.* Kidney Int 1997; 52, 942–952.