

0524
119



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL DAÑO RENAL POR
CICLOSPORINA A Y SU RESPUESTA AL TRATAMIENTO
CON EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA-BIOLOGA
PRESENTA

ROCIO MUÑOZ SALAS



MEXICO, D. F.



2003

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL: PROF. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO
SECRETARIO: PROF. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
1^{ER} SUPLENTE: PROF. JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ
2° SUPLENTE: PROF. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 209, Edificio B, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

El presente trabajo fue apoyado por: CONACYT (25441-M).

Asesora: Dra. María Elena Ibarra Rubio



Sustentante: Rocío Muñoz Salas



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas u.
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo ~~residencial~~
NOMBRE: Muñoz Salas Rocío

FECHA: 4 - Feb - 2003

FIRMA:  2

ABREVIATURAS:

ANOVA	Análisis de varianza
APC	Células presentadoras de antígeno
ASB	Albúmina sérica bovina
BUN.....	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
CD	Designación de grupo
CnA	Ciclofilina A
CnB	Ciclofilina B
CsA	Ciclosporina A
Cu,Zn-SOD.....	Superóxido dismutasa de cobre y zinc.
DDC.....	Dietilditiocarbamato
EAE	Extracto de ajo envejecido
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GPX	Glutatión peroxidasa
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
IL-2	Interleucina 2
IRA	Insuficiencia renal aguda
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Mn-SOD.....	Superóxido dismutasa de manganeso
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NADP	Nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
NFAT	Factor nuclear activador de linfocitos T
SO ₂	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TCR	Receptor de células T

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	
1. Generalidades de las especies reactivas de oxígeno (EROs).....	3
1.1 Anión superóxido (O_2^-).....	4
1.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	4
1.3 Radical hidroxilo ($OH\cdot$).....	4
1.4 Singlete de oxígeno (1O_2).....	5
2. Defensas naturales contra las especies reactivas de oxígeno.....	5
2.1 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos.....	6
2.2 Mecanismos antioxidantes enzimáticos.....	6
2.2.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	7
a) Superóxido dismutasa cobre y zinc (Cu,Zn-SOD).....	7
b) Superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD).....	8
c) Superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD).....	8
2.2.2 Catalasa (CAT).....	8
2.2.3 Glutatión peroxidasa (GPx).....	8
a) GPx citosólica.....	9
b) GPx extracelular.....	9
c) GPx gastrointestinal.....	9
d) GPx de fosfolípidos.....	9
3. Riñón.....	10
3.1 Insuficiencia renal aguda (IRA).....	12
4. Sistema inmunológico.....	13
4.1 Características generales de la respuesta de linfocitos T al antígeno.....	14
5. Ciclosporina A (CsA).....	16
5.1 Estructura química.....	16
5.2 Farmacocinética.....	17
5.3 Mecanismo de acción.....	17
5.4 Nefrotoxicidad de la CsA por la participación de EROs.....	19
6. El ajo.....	20
6.1 Algunas propiedades terapéuticas del ajo.....	22

6.2 Evidencias que apoyan las propiedades antioxidantes del ajo.....	22
7. Justificación.....	23
III. OBJETIVOS.....	24
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
1. Reactivos.....	25
2. Dieta.....	2
3. Animales.....	25
4. Diseño experimental.....	25
5. Determinaciones.....	26
5.1 Determinaciones de daño renal.....	27
5.1.1 Nitrógeno de urea (BUN).....	27
5.1.2 Creatinina.....	28
5.1.3 Estudios histológicos.....	28
5.2 Actividad renal de las enzimas antioxidantes.....	29
5.2.1 Actividad de GPx.....	29
5.2.2 Actividad de SOD.....	30
a) Mn-SOD.....	31
b) Cu,Zn-SOD.....	32
5.2.3 Actividad de CAT.....	32
6. Análisis Estadístico.....	32
VI. RESULTADOS.....	33
1. Consumo de alimento.....	33
2. Peso corporal.....	33
3. Determinaciones de daño renal.....	34
3.1 Nitrógeno de urea en sangre (BUN).....	34
3.2 Creatinina.....	35
3.3 Estudio histológico.....	36
4. Actividad renal de las enzimas antioxidantes.....	36
4.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	36
4.2 Catalasa (CAT).....	37
4.3 Glutatión peroxidasa (GPx).....	39
VII. DISCUSIÓN.....	41
VIII. CONCLUSIONES.....	45
IX. APÉNDICES.....	46

1. Nitrógeno de urea en sangre.....	46
2. Creatinina en suero.....	46
3. Histología.....	47
4. Homogenización de riñón para la determinación de las enzimas antioxidantes GPx, SOD y CAT.....	48
5. Proteínas totales por el método de Lowry.....	50
6. Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	53
7. Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	54
7.1 Actividad de superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD).....	58
8. Actividad de Catalasa.....	59
X. BIBLIOGRAFÍA.....	61

I. RESUMEN

La ciclosporina A (CsA) es un fármaco ampliamente utilizado en la prevención del rechazo de órganos trasplantados; su selectiva acción inhibitoria de la activación y proliferación de linfocitos T la caracterizan como un fármaco ideal en la terapia de inmunosupresión. Sin embargo, bajo ciertas condiciones este medicamento causa serios efectos nefro y hepatotóxicos. Existen muchas evidencias de que en estos efectos tóxicos están involucradas las especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales reaccionan con prácticamente todos los tipos de biomoléculas. Debido al gran interés clínico que tiene este medicamento, ya que mejora de manera importante las condiciones de vida y supervivencia de los pacientes que lo utilizan, los objetivos de este trabajo fueron: a) estudiar el comportamiento de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD total, Cu,Zn-SOD y Mn-SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en el daño renal inducido por ciclosporina A, y b) evaluar si un agente antioxidante como el extracto de ajo envejecido, evita o disminuye el daño renal inducido por ciclosporina A y si esto se asocia a cambios en las enzimas antioxidantes antes mencionadas.

Para cumplir con estos objetivos fue necesario establecer previamente las condiciones para desarrollar un esquema de inducción de daño renal por este medicamento. Se utilizaron ratas macho Wistar con un peso inicial aproximado de 240 g, las cuales fueron uninefrectomizadas para simular las condiciones de un paciente al que se le realizó un trasplante de riñón. Quince días después de esta cirugía se formaron cuatro grupos tratados de la siguiente manera:

Grupos	Administración Intragástrica	Administración Subcutánea
Control	solución salina isotónica	aceite de oliva
Ajo	extracto de ajo envejecido	aceite de oliva
CsA	solución salina isotónica	CsA (30 mg/Kg)
CsA+EAE	extracto de ajo envejecido	CsA (30 mg/Kg)

Todas las ratas tuvieron libre acceso al agua de beber. Las ratas tratadas con CsA fueron alimentadas *ad libitum*, y los tres grupos restantes fueron alimentados a la par con respecto al grupo CsA. Los tratamientos fueron administrados cada 24 horas durante siete días, al término de los cuales los animales fueron sacrificados para la obtención de las muestras.

Para comprobar el daño renal se determinaron los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN) y de creatinina en suero, y se realizó un análisis histológico por medio de microscopia de luz. Posteriormente, se realizaron las determinaciones de la actividad de las enzimas GPx, CAT y SODs en el riñón.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los marcadores de función renal utilizados (creatinina y BUN) se encuentran aumentados al administrarse CsA, demostrándose con esto el establecimiento del daño renal, así como con los estudios histológicos, donde se observaron alteraciones estructurales en el túbulo proximal inducidas por el fármaco. El tratamiento con el EAE indujo una protección contra las alteraciones observadas en el grupo tratado con CsA, ya que el aumento observado en los niveles de creatinina y de BUN se previene o disminuye con este antioxidante, así como el daño renal observado en el análisis histológico. En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas, se encontró que la GPx disminuye con el tratamiento con CsA y esta disminución se evita parcialmente con el EAE; las SODs y la actividad de CAT no presentan cambios. Por los resultados obtenidos se puede concluir que: a) hay una respuesta diferencial de la actividad de las enzimas estudiadas, la disminución de la actividad renal de GPx podría tener algún papel en el desarrollo del daño renal, y b) El EAE disminuye el daño renal inducido por CsA y esto puede deberse, al menos en parte, a su efecto sobre la actividad de GPx.

II. INTRODUCCIÓN.

1. Generalidades de las especies reactivas de oxígeno (EROs)

Un radical libre es una especie química que contiene electrones desapareados y puede formarse tanto por la pérdida (oxidación) como por la ganancia (reducción) de electrones. Los radicales libres son altamente reactivos ya que buscan completar su último par electrónico reaccionando con otro radical o sustrayendo electrones a otra especie química convirtiéndola, a su vez, en un radical (Zentella & Saldaña, 1995).

En los organismos aerobios, el oxígeno (O_2) es esencial en el mantenimiento de la vida, ya que es el aceptor de electrones final de la cadena respiratoria. Sin embargo, la reducción incompleta del oxígeno genera intermediarios conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs). Estos son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el singulete de oxígeno (1O_2) (Fig. 1). Estas especies son generadas durante el metabolismo normal de las células e intervienen en procesos importantes como la fagocitosis durante la eliminación bacteriana en los procesos infecciosos (Bast *et al.*, 1991). Sin embargo, estas especies reactivas ocasionan daño celular actuando sobre la mayoría de las moléculas biológicas como es el caso de aminoácidos, carbohidratos, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Stadtman, 1990), por lo que la célula cuenta con sistemas de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos, de los cuales se hablará más adelante. Entonces, cuando se presenta un desequilibrio entre la producción de EROs y los sistemas celulares de defensa antioxidante se genera un estado patológico. Por esta razón, existe una variedad de enfermedades donde se ha demostrado que las EROs están involucradas, como por ejemplo cáncer, fibrosis pulmonar, isquemia-reperusión, artritis reumatoide y colitis inflamatoria etc. (Matés *et al.*, 1999).

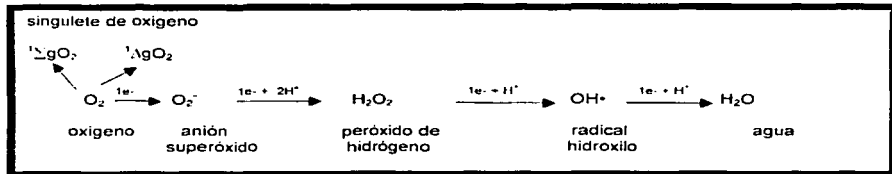


Fig. 1. Intermediarios conocidos como EROs.

1.1 Anión superóxido (O₂⁻)

El O₂⁻ se origina a partir de la incorporación de un electrón a la molécula de oxígeno, es un agente tóxico y puede transformarse a peróxido de hidrógeno (reacción 1). Este radical se genera en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria (Zentella & Saldaña, 1995). Además, la producción de este radical vía NADPH oxidasa es importante, ya que participa en las células del sistema inmune como parte de la cascada de eventos en la respuesta tisular para eliminar microorganismos y material ajeno a través de la acción antimicrobiana de las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) (Bannister & Rotillo, 1987).



1.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Esta especie reactiva no es un radical libre, ya que no posee electrones desapareados. El H₂O₂ se descompone en moléculas de agua por la intervención de enzimas como catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión transferasa. Aunque esta transformación es muy rápida, se pueden presentar condiciones que modifiquen el funcionamiento de estas enzimas, entonces el peróxido de hidrógeno puede producir radical hidroxilo, por medio de la reacción descrita por Haber & Weiss, (reacción 2). En realidad esto es lo peligroso del H₂O₂, ya que es un agente que puede difundir fácilmente a través de las membranas celulares y participar en la formación del OH• que es altamente reactivo.



También, el H₂O₂ puede interactuar con halógenos y el sistema de la mieloperoxidasa para producir ácidos como el hipocloroso, hipobromoso, etc. (reacción 3). Por esta razón, se le considera un oxidante importante en las células endoteliales y en plaquetas, y su vida media depende de la presencia o ausencia de las enzimas encargadas de removerlo del medio.



1.3 Radical hidroxilo (OH•)

El radical OH• es considerado una de las especies oxidantes más dañinas ya que reacciona a una velocidad muy alta con casi todas las moléculas biológicas (carbohidratos, aminoácidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos), formando, entre otros productos, radicales libres de las moléculas con las que reaccionó (Jassen *et al.*, 1993). Tiene un tiempo de vida media de 10⁻⁹ segundos y puede generarse de varias formas, una de ellas es por la ruptura homolítica del H₂O₂ generando el radical hidroxilo y un

ion hidróxido que se protona para formar agua (llamada reacción de Habber-Weiss, reacción 2). Otra forma de generar OH⁻ es la vía descrita por Fenton donde participan el anión superóxido y metales de transición (Fig. 2). Sin embargo, la vía por la cual es generado este radical *in vivo* es aún objeto de discusión en la bioquímica de los radicales (Olinescu & Smith, 2002).

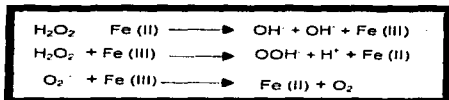


Fig. 2. Generación del radical hidroxilo por reacción de Fenton.

Aparte de las vías antes mencionadas, ha sido descrita otra forma de producción de OH⁻, que no requiere de la presencia de los metales de transición. Esta vía involucra al O₂ y al óxido nítrico (Fig. 3).

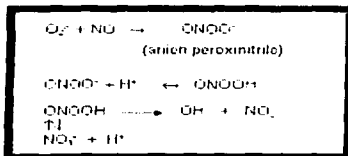


Fig. 3. Vía alternativa de generación de OH⁻.

1.4 Singuleto de oxígeno (¹O₂)

Esta especie se forma por la inversión del spin de uno de los electrones de la molécula de oxígeno, entonces esta especie reactiva de oxígeno no tiene electrones desapareados, por lo que realmente no es un radical libre, pero es muy reactiva; se forma cuando algunos pigmentos son iluminados en presencia de oxígeno o por la reacción del ácido hipocloroso (reacción 4). Presenta una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo con lípidos de membrana (Maldonado, 2000).



(4)

2. Defensas naturales contra las especies reactivas de oxígeno

La citocromo oxidasa es la responsable de la reducción tetravalente de más del 90% del oxígeno en el organismo, y esta reducción del oxígeno hasta agua se lleva a cabo sin la liberación de

intermediarios potencialmente tóxicos. Sin embargo, la reducción incompleta del oxígeno puede generar EROs (Fig. 1), por lo que las células cuentan con numerosos mecanismos de protección contra los efectos dañinos de los radicales libres. Estos sistemas de defensa antioxidante pueden ser o no de naturaleza enzimática.

2.1 Mecanismos antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser clasificados en base a su solubilidad en solventes polares o apolares. En las tablas 1 y 2 se resumen las características de los principales antioxidantes no enzimáticos liposolubles e hidrosolubles respectivamente (Kriskey & Deneke, 1982; Kriskey, 1992; Norberg & Arner, 2001)

Tabla 1. Algunos antioxidantes no enzimáticos liposolubles.

Antioxidante	Acción antioxidante
Vitamina E	Posee actividad antioxidante muy potente. Bloquea la cadena de la lipoperoxidación por atrapar el radical peroxilo (ROO^{\bullet}) (Norberg & Arner, 2001).
Vitamina A, β carotenos y otros carotenoides relacionados con pigmentos de plantas	Tienen capacidad de atraparadores de EROs como el 1O_2 por lo que, por ejemplo, protegen contra la lipoperoxidación (Kriskey, 1982)
Bilirrubina	Atrapa especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, y reacciona con el ROO^{\bullet} y con el 1O_2 (Kriskey, 1992).

Tabla 2. Algunos antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles (Kriskey, 1992).

Antioxidante	Acción antioxidante
Vitamina C	Atrapa radicales libres, reacciona con el $O_2^{\bullet-}$ y con el OH^{\bullet} , y puede restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E.
Glutatión	Es el sustrato de la GPx en el ciclo redox, reacciona con el OH^{\bullet} y con el 1O_2 , así como con radicales libres orgánicos.
Ácido úrico	Atrapa OH^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, ROO^{\bullet} y se une a metales de transición.

2.2 Mecanismos antioxidantes enzimáticos.

Existen varias enzimas que forman parte de este sistema antioxidante, entre las principales encontramos a la glutatión peroxidasa (GPx), a la superóxido dismutasa (SOD) y a la catalasa (CAT) (Fig. 4). Estas llevan a cabo la protección en los lugares especialmente susceptibles a los oxidantes

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

como son el epitelio pulmonar y los glóbulos rojos, donde estas enzimas existen en mayor cantidad que en otras células (Yu *et al.*, 1994).

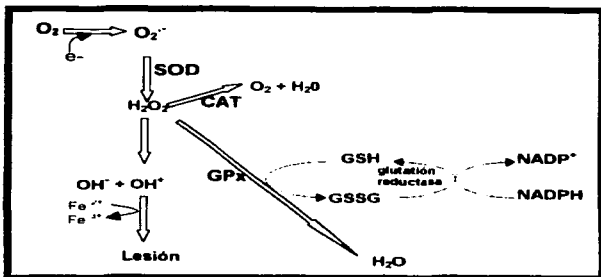
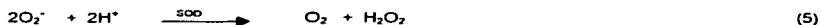


Fig. 4. Cascada de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT).

2.2.1 Superóxido dismutasa (SOD).

La SOD es una metaloenzima que cataliza la conversión del radical $O_2^{\bullet-}$ en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (reacción 5). En las células eucariotas existen tres isoformas de esta enzima, y todas son productos de genes nucleares diferentes y se sintetizan en los ribosomas citoplásmicos (Ho *et al.*, 1991). Dos de estas isoformas contienen cobre y zinc en su sitio activo, y la tercera contiene manganeso.



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

Esta enzima se localiza principalmente en el citoplasma de células eucariotas, sin embargo se ha encontrado también en lisosomas, núcleo y en menor cantidad en los peroxisomas (Weisger & Fridovich, 1973). Es una hemoproteína de 34 kDa en rata, que contiene 4 subunidades, y cada subunidad contiene 151 aminoácidos junto con un átomo de Cu^{2+} y otro de Zn^{2+} unidos por el imidazolato de una histidina. Esta isoforma cataliza la dismutación del anión superóxido a través de la reducción-oxidación alternativa del cobre (Hsu *et al.*, 1992; Tainer *et al.*, 1983) (Fig. 5).

TESIS CON
ZONA DE ORIGEN

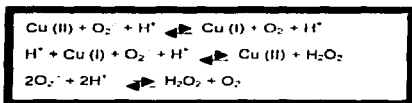


Fig. 5. Dismutación del anión superóxido a través de la reducción-oxidación alternativa del cobre.

b) Superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD).

Esta isoenzima es un tetrámero, contiene un átomo de Mn^{2+} por subunidad, y tiene un peso molecular de 85 KDa en rata. Aunque la Mn-SOD del humano y de la rata son similares en el contenido de los aminoácidos, la localización y niveles de actividad presente en tejidos de estas especies es diferente. Por ejemplo, en el hígado humano está presente en el citoplasma y en la mitocondria y representa más del 50% de la actividad total de SOD (Salin *et al.*, 1978), mientras que en el hígado de rata se localiza estrictamente en la matriz mitocondrial y representa sólo el 10% o menos de la actividad de SOD total. La dismutación del anión superóxido ocurre porque el átomo de manganeso cambia su estado de oxidación al interactuar con él.

c) Superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD)

Es una glicoproteína tetramérica de 118 KD en rata, fue descrita por Marklund en 1982 y contiene cobre y zinc en su sitio activo (Marklund, 1982). Esta isoenzima se localiza en fluidos como plasma, líquido sinovial y linfa, y se ha sugerido que su sitio de síntesis son las células endoteliales, y que cuando está unida a ellas funciona como una cubierta protectora. Posee afinidad por la heparina y por los proteoglicanos de sulfato de heparán, característica que no poseen las otras isoenzimas (Marklund, 1982).

2.2.2 Catalasa (CAT)

La CAT reacciona rápidamente con el H_2O_2 convirtiéndolo en agua y oxígeno (reacción 6). Es una hemoproteína tetramérica con cuatro ferriprotoporfirinas y tiene un PM de 240 KDa en rata (Aebi, 1982). En tejidos de mamífero, esta enzima está presente en altas concentraciones en hígado y en riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo. En general, en las células está presente principalmente en peroxisomas y mitocondrias.



2.2.3 Glutatión peroxidasa (GPx)

Para reducir el H_2O_2 a agua, la GPx cataliza la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), el cual, a su vez, es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH, formándose un ciclo redox e impidiendo que se agoten las reservas de GSH (Fig. 6). Los

TESIS CON
PALE DE ORIGEN

niveles de NADPH son regenerados por la acción de las enzimas málicas y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.



Fig. 6. Participación de la GPx en la reducción del H_2O_2 .

Se han identificado cuatro tipos de GPx, todas ellas dependientes de un átomo de selenio: GPx citosólica, GPx extracelular, GPx gastrointestinal y GPx de fosfolípidos (tabla 3).

a) GPx citosólica: Es una proteína tetramérica con cuatro subunidades idénticas (homotetrámeros), con un peso molecular de 84 KDa en rata. La GPx citosólica tiene función antioxidante bajo condiciones donde hay relativamente grandes cantidades de H_2O_2 o hidroperóxidos de lípidos que son producidos en el citosol (Burk, 1991).

b) GPx extracelular: Es una proteína homotetramérica de 100 KDa en rata. Es la responsable de toda la actividad peroxidasa en el plasma (Takahashi *et al.*, 1990). Se ha demostrado por inmunoblot, Northern blot, clonación y estudios de hibridación *in situ*, que el riñón es el principal sitio de síntesis de esta enzima en ratas, humanos y ratones (Yoshimura *et al.*, 1994). Por medio de técnicas moleculares se ha demostrado que está presente en las células epiteliales de los túbulos proximales y en las células parietales de la cápsula de Bowman (Avissar *et al.*, 1994).

c) GPx gastrointestinal: Es un tetrámero de 75 KDa en rata y se localiza en el citosol. Puede metabolizar peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de ácidos grasos eficientemente. Se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal de los roedores y en el caso de los humanos se ha encontrado en hígado y colon (Chu *et al.*, 1993).

d) GPx de fosfolípidos: Es la única isoforma de GPx que es un monómero y pesa aproximadamente 20-22 KDa en rata. Es una hidroxiperoxidasa de fosfolípidos, está unida a membranas intracelulares, su actividad se encuentra abundantemente en testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (Roveri *et al.*, 1992). Se ha reportado que reduce hidroperóxidos de colesterol entre los cuales está el 7 β -hidroxiperóxido de colesterol, uno de los compuestos más citotóxicos de las lipoproteínas estudiadas (Brigelius-Flohé *et al.*, 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Algunas características de las diferentes isoformas de GPx (Chu *et al.*, 1993).

ISOFORMA	LOCALIZACIÓN	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR
GPx citosólica	citosol	tetrámero	84 KDa (rata)
Gpx extracelular	extracelular	tetrámero	100 KDa (rata)
GPx gastrointestinal	gastrointestinal	tetrámero	75 KDa (rata y humano)
GPx de fosfolípidos	membranas	monómero	21 KDa (rata)

3. Riñón

En condiciones normales, el riñón se encarga de la excreción de productos finales del metabolismo, del mantenimiento del pH de los fluidos corporales, del mantenimiento de la presión sanguínea dentro de los límites tolerables para la vida, así como de mantener el agua y electrolitos circulantes dentro de valores fisiológicos. El riñón está dividido en dos grandes secciones: la corteza y la médula (Fig. 7). En la corteza se localizan los glomérulos, los cuales se encargan de la filtración de la sangre, mientras que los túbulos están en la corteza y en la médula, y se encargan de transformar el fluido tubular en orina mediante diferentes procesos de reabsorción y secreción.

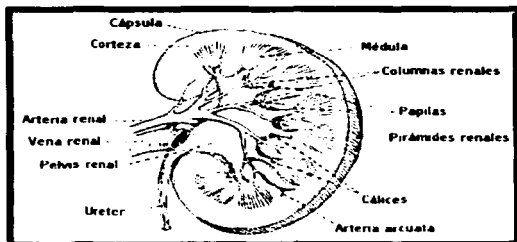


Fig. 7. Diagrama de un corte longitudinal de riñón donde se muestran sus estructuras anatómicas principales. (Brenner & Rector, 2000).

La unidad morfofuncional del riñón se conoce como nefrona, y en el humano cada riñón contiene aproximadamente un millón de nefronas. Esta estructura está formada por un glomérulo y un túbulo, el cual está subdividido en túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y ducto colector (Fig. 8).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

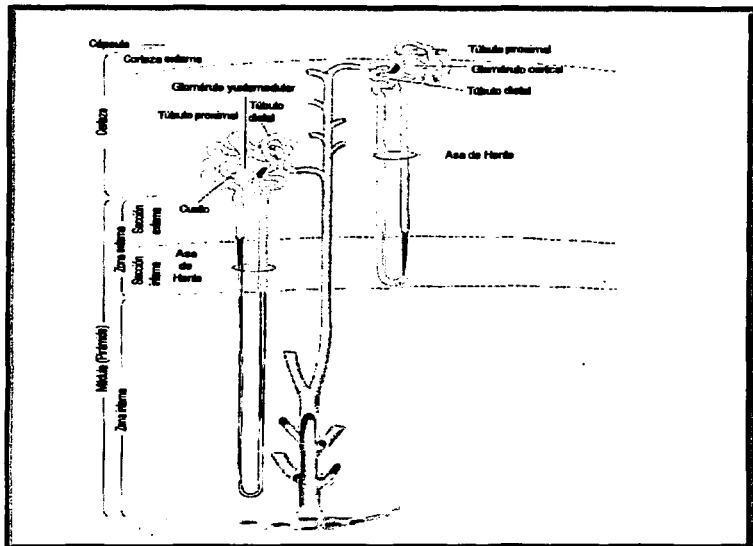


Fig. 8. Estructura de la nefrona y su ubicación en el riñón (Netter, 1997).

El glomérulo está constituido por capilares sanguíneos, y está rodeado por la cápsula de Bowman, los capilares están irrigados por una arteriola aferente y son drenados por una arteriola eferente. El líquido que se filtra a través del glomérulo hacia la cápsula de Bowman recibe el nombre de filtrado glomerular, y la membrana a través de la cual se realiza esta filtración se conoce como barrera de filtración glomerular, que consta de tres capas principales:

- 1) La capa de células endoteliales, las cuales están dispuestas a lo largo de la parte interna de la membrana basal glomerular, por lo que están en contacto con la sangre. Miden aproximadamente 40 nm de grosor, y una de sus características es que presentan agujeros o fenestras.
- 2) La membrana basal, compuesta principalmente por un entramado de fibras de colágeno y proteoglicanos, quedando espacios entre éstas por donde el líquido puede pasar fácilmente.

3) La capa de células endoteliales situada en la superficie exterior de los capilares glomerulares, las cuales presentan proyecciones citoplásmicas llamadas podocitos que abrazan al capilar, en ellos se encuentran sialoproteínas. La superficie de las sialoproteínas está cargada negativamente, por lo que la filtración es mayor para las sustancias catiónicas que para las neutras y las cargadas negativamente.

De acuerdo a la composición de la barrera de filtración, las características como el tamaño de las moléculas, la deformidad, la carga eléctrica y la configuración molecular, así como la hemodinámica glomerular, son los factores que determinan el paso de las moléculas por dicha barrera. Después que el filtrado glomerular ha pasado por la cápsula de Bowman, pasa al túbulo proximal situado en la corteza renal, donde se reabsorben varias moléculas, de manera más importante glucosa y aminoácidos. Posteriormente, el filtrado pasa por el asa de Henle situada en la médula renal; este segmento está formado por una porción descendente que reabsorbe al potasio y a otros iones, y por una porción ascendente en donde tiene lugar un importante transporte activo de iones sodio y cloro de la luz tubular hacia el espacio intersticial. Después, el filtrado pasa al túbulo distal, que se encuentra de nuevo en la corteza renal; este túbulo reabsorbe iones sodio y en él tiene lugar la secreción de potasio controlada por la aldosterona y otros factores como la concentración de este ión en los líquidos corporales, por lo que el potasio es secretado activamente en estos segmentos tubulares, constituyendo el principal mecanismo de regulación de la concentración de potasio en el líquido extracelular. Finalmente, pasa al túbulo colector que reúne el líquido de varias nefronas, para luego vaciarse en la pelvis renal. Entonces, el filtrado glomerular pasa a través de los túbulos, éstos permiten que parte del agua y cantidades variables de solutos se reabsorban, y el agua y solutos que no se reabsorbieron, junto con los que se secretan, forman la orina (Brenner & Rector, 2000; Guyton, & Hall, 1997).

3.1 Insuficiencia renal aguda (IRA):

La insuficiencia renal aguda (IRA), es una enfermedad caracterizada por la disminución abrupta de la filtración glomerular, que da como resultado la acumulación en circulación de productos finales del metabolismo como creatinina y urea. La IRA es usualmente asintomática y reversible, y se detecta mediante un perfil bioquímico midiendo por ejemplo creatinina en plasma (Guyton & Hall, 1997). La IRA puede evolucionar a una insuficiencia renal crónica (IRC), la cual es irreversible, por lo que puede llevar a la muerte si el paciente no se dializa o se le realiza un trasplante de riñón. Por esta razón, es muy importante diagnosticar y tratar a tiempo, ó hacer lo posible por evitar la IRA, sobre todo en pacientes que están bajo riesgo de desarrollarla.

La IRA puede producirse como consecuencia de alteraciones en el proceso de ultrafiltración de la sangre que entra a los glomérulos, alteraciones en los procesos de reabsorción y secreción, o bien, por insuficiencia de la perfusión renal. La IRA generalmente es causada por isquemia o por diferentes

agentes como antibióticos, anestésicos, venenos, inmunosupresores, solventes orgánicos o metales pesados.

4. Sistema inmunológico

Debido a que la función de la CsA está relacionada con la inmunidad, a continuación se explica de manera muy general lo que es la respuesta inmune.

El sistema inmune es el encargado de mantener a un individuo libre de infecciones atacando a cualquier cuerpo extraño. La resistencia a las infecciones puede ser natural (inmunidad innata) o se puede desarrollar (inmunidad adquirida). La inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra los microorganismos.

La inmunidad adquirida es un mecanismo de defensa mucho más evolucionado que es estimulado tras la exposición a agentes infecciosos y se caracteriza por ser específica, siendo los responsables de este tipo de inmunidad los linfocitos y sus productos (Rojas, 1996). La respuesta inmunitaria adquirida amplifica los mecanismos de la inmunidad natural, y potencia su función sobre todo tras la exposición repetida al mismo antígeno.

La respuesta inmunitaria adquirida se clasifica en dos tipos, según el componente del sistema inmunitario que participa en la respuesta (Abbas *et al.*, 1999):

- 1) Respuesta inmunitaria humoral: consiste en la participación de las células llamadas linfocitos B.
- 2) Respuesta inmunitaria mediada por células o inmunidad celular: consiste en la participación de células llamadas linfocitos T.

Los linfocitos son las únicas células inmunocompetentes capaces de reconocer la forma específica de los antígenos. Son morfológicamente homogéneos pero hay varios grupos que realizan funciones diferentes. Se ha desarrollado un método sistemático de nomenclatura, denominado CD (del inglés *cluster designation* = denominación de grupo), el cual designa grupos de anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une específicamente a un determinado marcador celular. En humanos, dentro de los linfocitos T se incluyen dos subtipos: los linfocitos T-CD4⁺ o linfocitos T cooperadores (Th) y los linfocitos T- CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos (Tc). El mejor marcador de los linfocitos T es el receptor de las células T (TCR, del inglés, *T cell receptors*). Hay dos tipos de TCR bien definidos, el TCR-2 que es un heterodímero compuesto de dos polipéptidos (α y β) unidos por un enlace disulfuro; y el TCR-1 que presenta una estructura parecida, pero los polipéptidos que lo integran son diferentes (γ y δ). Ambos receptores se encuentran asociados a un conjunto de cinco polipéptidos, el complejo CD3, y juntos forman el complejo receptor de las células T (Roitt *et al.*, 1997).

4.1 Características generales de la respuesta de linfocitos T al antígeno

El reconocimiento del antígeno por las células T da lugar a respuestas funcionales que son muy importantes en la inmunidad mediada por células y en la inmunidad humoral. Estas respuestas incluyen la diferenciación y la activación:

-La diferenciación, es el proceso que transforma a los linfocitos T no estimulados, en células efectoras que desempeñan varias funciones. Este proceso de diferenciación depende de la activación de las células T inducida por el antígeno, y de las acciones de otros factores tales como citocinas y señales derivadas de moléculas accesorias. El proceso de diferenciación conlleva cambios en el control transcripcional de los genes que codifican moléculas efectoras liberadas por las células T, como citocinas, así como el control de la expresión de las moléculas de la superficie en la célula T.

-Después de la diferenciación de los linfocitos T, sigue el proceso de activación, en el cual se lleva a cabo el reconocimiento de antígenos específicos por parte de estos linfocitos y que involucra un receptor en la superficie de dichas células (TCR). Para generar o inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T-CD4⁺, las células presentadoras de antígeno (APC) internalizan al antígeno y lo procesan generando péptidos de ocho a catorce aminoácidos de longitud (inactivada), los cuales más tarde son ensamblados con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) clase II y son expuestos en la superficie celular de la APC (Fig. 9a). La unión de receptores específicos de los linfocitos T al complejo péptido-MHC clase II, activa a la célula T-CD4⁺ para que prolifere y con ello libere linfocinas (glucoproteínas que actúan como mediadores de la reacción inflamatoria), las cuales son necesarias para que se originen los otros dos componentes de esta respuesta inmunitaria, que son los linfocitos T citotóxicos y la respuesta de anticuerpos.

El componente peptídico del MHC clase II se deriva de proteínas exógenas. Las proteínas endógenas también son expuestas en la superficie de las APC, pero se ligan a los péptidos del MHC clase I para su exposición. El reconocimiento y la unión del receptor de células T-CD8⁺ al complejo péptido-MHC clase I, en forma concertada con las linfocinas de las células T-CD4⁺ cooperadoras, hacen que se activen las células T citotóxicas capaces de lisar directamente células que ya han procesado al antígeno, y que, además, poseen en su superficie el complejo específico péptido-MHC (Fig. 9c).

Todas las células expresan sobre su superficie una enorme cantidad y diversidad de moléculas a las que se les puede llamar antígenos celulares o marcadores de superficie. Las diferencias antigénicas entre individuos de la misma especie se restringen a las diferencias en los antígenos celulares propios de cada individuo. Aunque todo el conjunto de diferencias antigénicas celulares podría influir en el reconocimiento y rechazo de un trasplante alogénico, solo un grupo de antígenos celulares es el responsable fundamental del rechazo. Estos antígenos se conocen con el nombre de antígenos de

histocompatibilidad y van a formar parte del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del cual ya se habló. En todas las especies estudiadas, la síntesis y expresión de los antígenos de histocompatibilidad, se encuentran bajo el control de un grupo de genes localizados en una región específica de un par cromosómico particular para cada especie. En el humano el MHC se encuentra localizado en el par cromosómico 6 y es denominada HLA (antígenos de los leucocitos humanos) (Rojas, 1996).

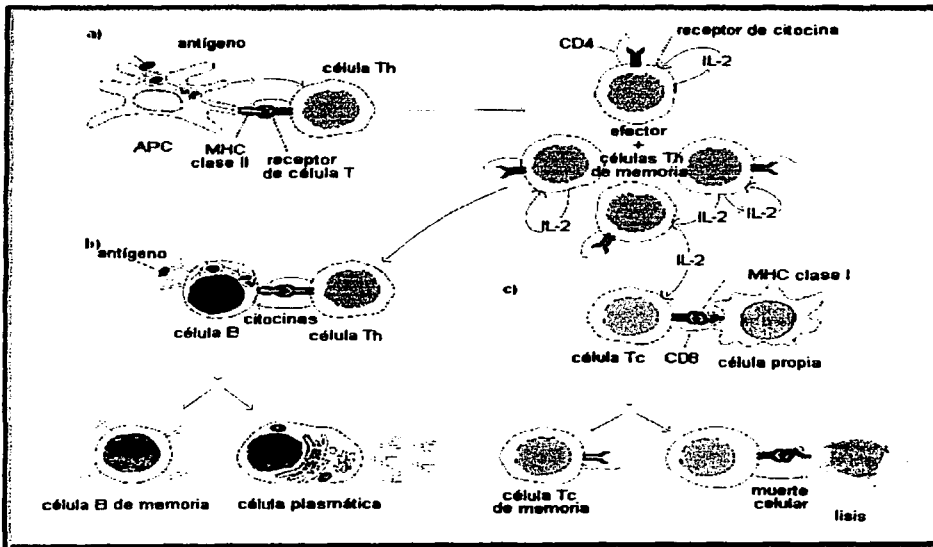


Fig. 9. Interacciones celulares involucradas en la inducción de la respuesta inmune adquirida: a) activación y proliferación de los linfocitos T-CD4 o cooperadores (célula Th), b) generación de la respuesta humoral y c) respuesta celular mediada por células propias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. Ciclosporina A (CsA)

La CsA revolucionó el trasplante de órganos debido a su potente actividad inmunosupresora y a su especificidad, ya que previene la activación de los linfocitos T de manera específica y reversible sin afectar su viabilidad, lo cual es muy importante ya que no se ve afectada la funcionalidad de los otros componentes del sistema inmune, como son los granulocitos, monocitos y macrófagos, que son los responsables de la fagocitosis, digestión y metabolismo específico de materiales extraños (Kahan, 1989; Matsuda *et al.*, 2000). De esta manera, el paciente transplantado evita el rechazo pero no queda expuesto a las infecciones. Asimismo, datos clínicos reportan su eficacia en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la psoriasis y síndrome nefrótico (Mowry & McCarthy, 1996).

5.1 Estructura química

La CsA es un undecapéptido cíclico altamente hidrofóbico con un peso molecular de 1202 KDa (Fig. 10). Los aminoácidos en las posiciones 1, 3 y 11 forman un sitio que es hidrofílico y es el sitio activo inmunosupresor (Kahan, 1989).

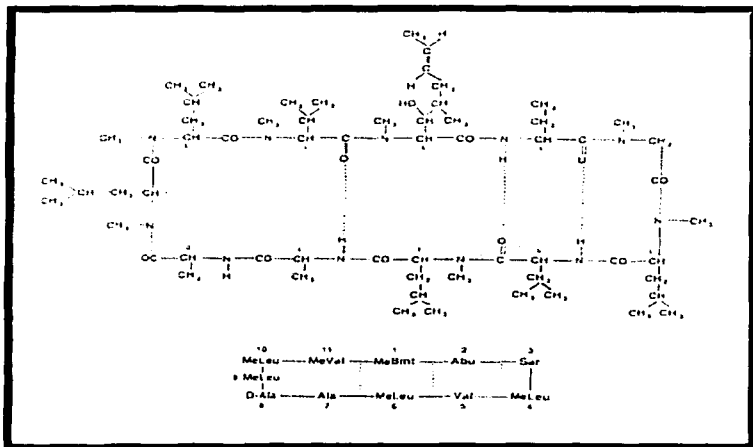


Fig. 10. Estructura de la CsA (Kahan, 1989).

5.2 Farmacocinética

Cuando la CsA se administra por vía oral su absorción puede ser baja, incompleta ó variable, ya que los procesos de absorción son adversamente afectados por algunos padecimientos como la producción de bilis o disfunción gastrointestinal (Kahan, 1989; Dunn *et al.*, 2001; Olyaei *et al.*, 1999) Su distribución en el plasma es de un 33 a un 47%, en los linfocitos de un 4 a un 95%, y en los granulocitos de un 5 a 12%. La CsA es metabolizada por enzimas hepáticas pertenecientes a la superfamilia de la citocromo P450 (3A4) (Ahmed *et al.*, 1995). Su principal eliminación es biliar (90%), el resto es excretada por orina (6%), del cual el 0.1% se elimina como fármaco no metabolizado (Kahan, 1989).

5.3 Mecanismo de acción

Para comprender mejor el mecanismo de acción por el cual actúa la CsA, a continuación se describen las características principales de las moléculas que intervienen en éste:

Ciclofilina A: pertenece a un grupo de proteínas llamadas inmunofilinas, que están presentes en todas las células eucariotas en altas concentraciones, se encuentra principalmente en el citosol, y es la inmunofilina más abundante en las células T (Matsuda & Kayasu, 2000). Aún no se comprenden bien sus funciones naturales, pero el complejo CsA/ciclofilina inhibe a la serina fosfatasa citoplásmica dependiente de $[Ca^{2+}/calmodulina]$ llamada calcineurina (Abbas *et al.*, 1999).

Calcineurina: es una fosfoproteína dependiente de Ca^{2+} que pertenece a la superfamilia de las serina/treonina fosfatasas. Está constituida por dos subunidades, la primera es la calcineurina A (CnA), que tiene actividad catalítica desfosforilando al factor nuclear activador de los linfocitos T (NFAT), y la segunda subunidad es la calcineurina B (CnB) que tiene función reguladora y que, a su vez, está regulada por la relación $Ca^{2+}/calmodulina$ (Matsuda & Kayasu, 2000).

Factor nuclear activador de linfocitos T (NFAT): actúa sobre regiones específicas del DNA induciendo la transcripción de varios genes en los linfocitos T entre los que están el de la IL-2 y otras citocinas; el NFAT está codificado por cuatro diferentes genes: NFATp, NFAT1, NFATc, NFAT3 (Olyaei *et al.*, 1999). La activación de NFAT depende de los aumentos de Ca^{2+} citoplásmico.

Interleucina 2 (IL-2): es conocida como el factor de crecimiento de las células T, además de potenciar el crecimiento de las células B. La región reguladora del gen IL-2 tiene secuencias

de bases que son el sitio de unión para varios factores de transcripción, entre ellos AP-1, NF- κ B, y el factor nuclear activador de linfocitos T (NFAT), todos estos factores de transcripción se requieren para estimular la transcripción del gen de la IL-2.

Entonces el mecanismo inmunosupresor propuesto para la CsA es a través de la inhibición de la síntesis de citocinas, principalmente IL-2 (Resch y Szamel *et al.*; 1997). En condiciones normales, la activación del receptor de superficie celular de los linfocitos T (TCR) causa un incremento del Ca^{2+} citosólico, lo que activa a la calcineurina por la vía [calcio/calmodulina] (Fig. 11). La calcineurina desfosforila a uno de sus sustratos, el NFAT citoplásmico, el cual, una vez desfosforilado entra al núcleo, y se combina con el componente nuclear del NFAT y este complejo regula la transcripción de varios genes, entre los que están el de la interleucina 2 (IL-2), y otras interleucinas (Abbas *et al.*, 1999; Campistol & Sacks, 2000). Entonces, el papel de la CsA en este proceso es unirse a la ciclofilina, y el complejo CsA-ciclofilina inhibe la activación de la calcineurina, por lo que no se lleva a cabo la desfosforilación del NFATc, y por lo tanto, la inducción transcripcional por parte de este factor no llega a término (Olyael *et al.*, 1999).

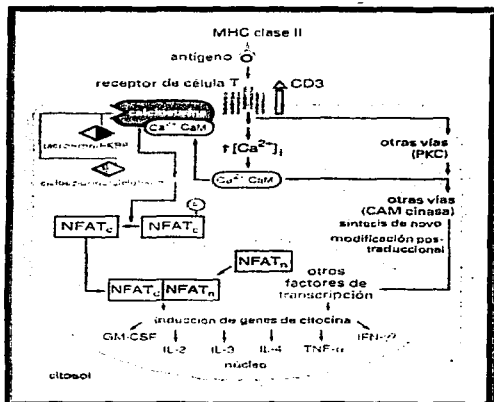


Fig. 11. Mecanismo de acción de la CsA. La CsA difunde fácilmente en el citoplasma de las células blanco. Entre las vías que inhibe está la transducción de señales activadas por los receptores de las células T. La activación del receptor de células T incrementa el calcio intracelular, el cual se combina con la calcineurina (CaM), y este complejo activa la fosfatasa de serina/treonina dependiente de Ca²⁺, conocida como calcineurina. Un sustrato de la calcineurina, es el componente citosólico del factor nuclear activador de linfocitos T (NFATc), al cual desfosforila. Una vez desfosforilado puede entrar al núcleo, y al asociarse con el componente nuclear del NFAT (NFATn), regula la transcripción de muchos genes que incluyen los que codifican las interleucinas 2,3,4, el factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el interferón γ (INF- γ). MHC = complejo principal de histocompatibilidad; PKC = proteína cinasa C (del inglés *protein kinase C*) (Goodman & Gilman, 1997).

5.4 Nefrototoxicidad de la CsA por la participación de EROs

Hay datos en la literatura que indican un papel de las EROs en el desarrollo de la nefrototoxicidad inducida por la ciclosporina A (tabla 4). Esto se ha demostrado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, varios estudios demuestran la generación de peróxido de hidrógeno por la CsA en células mesangiales y el aumento en la producción del anión superóxido en el glomérulo (Perez de Lema *et al.*, 1998); además, estudios *in vivo* han mostrado que una generación aumentada de EROs por la CsA en el riñón, puede ser bloqueada mediante antioxidantes (Pérez de Lema *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Evidencias que sugieren un papel de las EROs en la insuficiencia renal aguda inducida por CsA

- La CsA aumenta la generación de peróxido de hidrógeno *in vitro* (Ahmed *et al.*, 1995; Parra *et al.*, 1998; Pérez de Lema., 1998; Wolf *et al.*, 1994a; Wolf, 1994b) e *in vivo* (Serino *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1998).
- La CsA induce un aumento de la peroxidación de lípidos, disminución de los niveles de NAHPH, del citocromo P450 microsomal renal y de la relación (GSH/GSSG) en la corteza renal, microsomas o en la mitocondria, tanto *in vitro* como *in vivo* (Inselmann *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1990; Wang & Salahudeen, 1995).
- La superóxido dismutasa o catalasa pueden evitar la disminución de la función renal inducida por la CsA, y un inhibidor de la xantina oxidasa, el oxipurinol, atenúa la citotoxicidad inducida por la ciclosporina *in vitro* (Wolf *et al.*, 1994a).
- CsA reduce los niveles de glutatión, y la administración de antioxidantes como la vitamina E, glutatión reducido, quinacrina, N-acetylcisteinada dá como resultado una atenuación marcada de los efectos dañinos de la CsA (Al Khader *et al.*, 1996; Kanji *et al.*, 1999; Kristopik *et al.*, 1997; Tarik *et al.*, 1999; Wang & Salahudeen, 1995).
- Una mayor peroxidación de lípidos y daño renal son observados en ratas con deficiencia de antioxidantes tratadas con CsA que en ratas normales (Kumano *et al.*, 1989).
- La peroxidación de lípidos inducida por CsA es bloqueada mediante un inhibidor del citocromo P450 (Serino *et al.*, 1993).

6. El ajo

El ajo es miembro de la familia *liliaceae* y su nombre botánico es *Allium sativum*; el término *Allium* procede de la palabra celta *all*, que significa ardiente o caliente, mientras que *sativum* es un término latino que significa cultivado (García & Sánchez *et al.*, 2000). El ajo ha sido utilizado médicamente desde tiempos muy antiguos, los babilonios, egipcios, chinos, romanos, vikingos e indios usaban ajo frecuentemente, pues lo recomendaban, por ejemplo, para desórdenes intestinales, heridas e infecciones respiratorias (Salazar, 2000).

La ciencia moderna ha encontrado que en el ajo existen diferentes compuestos que presentan efectos terapéuticos; la mayoría de los investigadores consideran que la clave de los efectos benéficos del ajo para la salud residen en su alto contenido de compuestos sulfurados, entre los que destacan la alicina, el ajoeno, la alicina, los tiosulfatos, el alil-mercaptano, el sulfuro de dialilo, y la S-alil-cisteína (García & Sánchez *et al.*, 2000). La mayoría de los compuestos azufrados no están presentes en las células intactas del ajo. Cuando el ajo es machacado, partido o cortado, varios de

sus componentes azufrados son liberados, abandonando el interior de las células y entonces interaccionan unos con otros para desencadenar una cascada de reacciones químicas, generando un elevado número de componentes. Así, por ejemplo, cuando la célula se rompe tiene lugar la reacción entre la enzima alinasa y los precursores volátiles S-alkenilcisteína, sulfoxido y ácido sulfónico, resultando la formación de diferentes tiosulfonatos y compuestos derivados relacionados con el ácido sulfónico (García & Sanchez *et al.*, 2000). Se pueden obtener distintos compuestos dependiendo del procedimiento de extracción que se emplee (Fig. 11), y se pueden clasificar en liposolubles e hidrosolubles por ejemplo cuando el ajo es sujeto a extracción con agua y etanol a temperatura ambiente se obtiene la alicina, la cual es responsable del olor del ajo. Con extracción más suave empleando etanol a temperaturas inferiores a 0°C, se obtiene alina que en presencia de alinasa, se descompone en ácido 2- propensulfónico, el cual se dimeriza a alicina (Block, 1995).

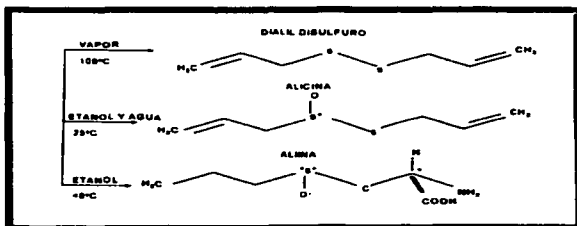


Fig. 12. Algunos compuestos sulfurados del ajo obtenidos dependiendo del tipo de extracción utilizada (Block, 1985).

Aunque hay muchos suplementos de ajo comercialmente disponibles, éstos caen en cuatro categorías: polvo de ajo deshidratado, aceite de ajo, macerado de ajo o extracto de ajo envejecido (EAE). La presentación de ajo utilizado para esta investigación fue el EAE, el cual, como su nombre lo indica, se envejece por más de 20 meses. El proceso de envejecimiento ayuda a convertir los compuestos olorosos, fuertes e irritantes en compuestos sulfurados estables y seguros (Amagase *et al.*, 2001). Este extracto se caracteriza por contener compuestos sulfurados solubles en agua, incluyendo la S-*alil*-cisteína y la S-*alil*-mercaptocisteína, y posee propiedades hepatoprotectoras y actividades anticancerígenas, así como efectos antioxidantes (Imai *et al.*, 1994).

6.1 Algunas propiedades terapéuticas del ajo

En estudios realizados con pacientes con enfermedad coronaria arterial, se ha observado que la medicación con aceite esencial de ajo durante 5 meses produce una disminución del 10% del colesterol del suero y un 21% de triglicéridos, y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se incrementan en un 31% y las de baja densidad (LDL) disminuyen en un 7.5% (Damnau *et al.*, 1991). Por otro lado, el ajo puede ser utilizado en el manejo de la hipertensión, ya que se ha demostrado que es capaz de incrementar, *in vivo*, la actividad de la sintetasa de óxido nítrico, enzima responsable de la formación de óxido nítrico o factor relajante derivado del endotelio (EDRF), potente vasodilatador, cuya liberación basal y constante contribuye al mantenimiento de la presión sanguínea sistémica dentro de los valores normales, disminuyéndola (Salazar Y, 2000). Asimismo, las plaquetas juegan un papel fundamental en la hemostasia, por lo que su inhibición resulta una vía válida para prevenir trombosis. Muchos de los compuestos sulfurados presentes en el ajo poseen propiedades de antiagregantes plaquetarios, como la alicina, el dialitrisulfuro y el alil 1,5- hexadienitrisulfuro, cuyas acciones *in vitro* han sido demostradas ampliamente (Salazar Y, 2000).

6.2 Evidencias que apoyan las propiedades antioxidantes del ajo

- Los compuestos organosulfurados del EAE son eficaces para atrapar H_2O_2 e inhibir la lipoperoxidación (Ide *et al.*, 1996).
- El ajo contiene selenio que es reconocido como antioxidante (Horie *et al.*, 1989).
- Se ha propuesto que los componentes azufrados del ajo actúan como precursores y generadores de GSH, o como antioxidantes *per se* (Block, 1995).
- Los extractos acuosos de ajo inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducida por Cu^{2+} (Horie *et al.*, 1989).
- El EAE previene la lipoperoxidación en homogenados de hígado de conejo inducida por el radical hidroxilo de una manera dosis dependiente (Prasad *et al.*, 1996).
- En células del endotelio vascular tratadas con EAE, disminuye la liberación de EROs, en particular de H_2O_2 , de manera dosis dependiente, en condiciones normales y cuando son expuestas a estrés oxidativo a través del sistema generador de aniones superóxido. Los niveles de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx aumentan en las células tratadas con EAE, lo cual puede explicar la disminución de H_2O_2 en estos cultivos (Wei *et al.*, 1998).
- En células del endotelio vascular tratadas con EAE, existe un incremento dependiente de la dosis y del tiempo en la actividad de SOD y glutatión reductasa, así como de los niveles de glutatión, lo que sugiere que este extracto puede modificar elementos enzimáticos y no enzimáticos del ciclo redox-GSH (Gend *et al.*, 1997).

- Estudios del efecto de la dieta de ajo al 2% demuestran que el ajo disminuye la producción de H_2O_2 *in vivo* (esto probablemente por sus propiedades antioxidantes) (Pedraza *et al.*, 2001).
- Las EROs están involucradas en la nefrotoxicidad por gentamicina, y esta toxicidad es disminuida cuando hay un tratamiento con ajo al 2% (Pedraza *et al.*, 2000).

7. Justificación

La CsA es un medicamento inmunosupresor utilizado ampliamente en la prevención del rechazo de órganos trasplantados, su selectiva acción inhibitoria en la activación y la proliferación de células T, la han caracterizado como un fármaco ideal para la terapia de inmunosupresión. Su eficacia ha sido demostrada al mejorar las condiciones de vida y supervivencia de los pacientes que la utilizan. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, este medicamento causa serios efectos nefro y hepatotóxicos (Adhirai & Selvam, 1998; Romano *et al.*, 2000; Remuzzi & Perico, 1995). Se ha encontrado en algunos estudios que en estos efectos tóxicos están involucradas las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Kumano *et al.*, 1989; Pérez de Lema *et al.*, 1998; Serino *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1986; Wolf *et al.*, 1994a). Por estas razones, se decidió estudiar el comportamiento de las enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), en un modelo de insuficiencia renal aguda inducida por CsA, y utilizar un agente antioxidante como el extracto de ajo envejecido (EAE) para ver si este evita o disminuye el daño renal, y si esta protección se da a través de cambios en las enzimas antioxidantes.

III. OBJETIVOS

1. Estudiar el comportamiento de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en la insuficiencia renal aguda inducida por CsA.
2. Evaluar si el extracto de ajo envejecido, agente antioxidante, evita o disminuye el daño renal inducido por ciclosporina A, y si esto se asocia a cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes antes mencionadas.

IV. HIPÓTESIS

Si el daño renal inducido por ciclosporina A está relacionado con la formación de especies reactivas de oxígeno, es de esperar que las enzimas antioxidantes se encuentren alteradas y que el extracto de ajo envejecido, agente antioxidante, proteja contra el daño renal, lo cual podría estar asociado a cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

La xantina oxidasa, el nitroazul de tetrazolo (NBT), la albúmina sérica bovina, el dietildicarbamato (DDC), el NADPH, la glutatión reductasa, el glutatión reducido y el tritón X100 fueron de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). La ciclosporina A (CsA) que se usó fue la presentación comercial Sandimmun[®] Neoral[®] con solución microemulsionada en cápsulas de 100 mg de Novartis (México, D.F.). Para las determinaciones de nitrógeno de urea y de creatinina se usó el estuche de Spinreact (Santa Coloma, España). Las sales de fosfato para los amortiguadores, el EDTA, el carbonato de sodio, el cloruro cúprico, el sulfato de amonio y el éter fueron de J.T. Baker (México, D.F.). El peróxido de hidrógeno fue de Mallinckrodt (México, D.F.). El extracto de ajo empleado para este estudio fue KYOLIC Liquid Aged Garlic Extract[™]. Las suturas utilizadas fueron 3-0 Silk (2 Metric) Black Braided T-5 26 mm de Sherwood Davis & Geck.

2. Dieta

Como dieta se utilizó alimento global para roedor 2018 de Harlan México S.A de C.V. (México. D.F.).

3. Animales

Este trabajo se realizó con ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 240 ± 9.7 g de Harlan México, que se obtuvieron y mantuvieron en el bioterio del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

4. Diseño experimental

En base a la literatura (Bobadilla *et al.*, 1994; Kumano *et al.*, 1989; Mihatsch *et al.*, 1986) y después de varias pruebas piloto, se decidió el siguiente diseño experimental: Las ratas utilizadas fueron uninefrectomizadas para simular las condiciones en las cuales se encuentra un paciente al que se le realizó un trasplante de riñón. La cirugía se realizó bajo anestesia con éter; se hizo una incisión en la parte superior del vientre, se localizó el riñón izquierdo y se descapsuló. Se ocluyeron las arterias y venas renales utilizando el hilo de la sutura, y se seccionaron estas lo más cerca posible al riñón, extrayéndolo. Posteriormente, se suturó la incisión y los animales se mantuvieron en observación durante 15 días, al término de los cuales se formaron cuatro grupos tratados de la siguiente manera:

Grupo	Administración intragástrica	Administración subcutánea
Control (Ct)	solución salina isotónica (400 µL)	aceite de oliva (70 µL)
Extracto de ajo envejecido (EAE)	extracto de ajo envejecido (400 µL)	aceite de oliva (70 µL)
Ciclosporina A (CsA)	solución salina isotónica (400 µL)	CsA (30 mg/kg)
CsA + EAE	extracto de ajo envejecido (400 µL)	CsA (30 mg/kg)

Nota: El número de animales para cada grupo fue de 12-13, el material utilizado para la administración intragástrica fue una jeringa de insulina a la que se le adaptó una manguera de látex de 0.86 mm de diámetro y de una longitud de aproximadamente 8 cm.

Todas las ratas tuvieron libre acceso al agua de beber. Las ratas tratadas con CsA fueron alimentadas *ad libitum* y los tres grupos restantes fueron alimentados a la par con respecto al grupo CsA, ya que en la literatura está reportado que las ratas tratadas con este fármaco disminuyen el consumo de alimento (Bobadilla *et al.*, 1994; Mihatsch, 1986), observación también encontrada en protocolos anteriores en nuestro laboratorio. En este estudio se estableció como día cero el día en que se dio inicio al tratamiento, el cual fue administrado cada veinticuatro horas durante siete días, al término de los cuales los animales se sacrificaron por decapitación para la obtención de las muestras de sangre y riñón. Después del sacrificio se recolectó la muestra de sangre y se extrajo rápidamente el riñón, al cual se le realizaron varios cortes transversales de aproximadamente 100 mg de peso, que fueron colocados en papel aluminio y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, guardándolos después a una temperatura de -70°C. Uno de estos cortes transversales se fijó en 1 ml de solución de formaldehído al 10% para los estudios histológicos.

Las muestras de sangre se dejaron reposar aproximadamente 30 minutos con el fin de separar el paquete globular del suero, para lo cual la muestra se centrifugó a 5000 rpm (radio 9.2 cm) durante 15 minutos. Posteriormente el sobrenadante se almacenó en alícuotas en tubos eppendorf a -20°C hasta la realización de las determinaciones correspondientes.

5. Determinaciones

Las determinaciones realizadas en el estudio fueron las siguientes: a) un registro diario del consumo de alimento y del peso corporal en los cuatro grupos de estudio; b) para comprobar el daño renal se determinó nitrógeno de urea en sangre (BUN) y creatinina en suero, y se realizó un análisis histológico; c) por último, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes en riñón: GPx, CAT y SOD (total, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD).

5.1 Determinaciones de daño renal

5.1.1 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

El origen de la urea es la descomposición metabólica de los aminoácidos de la dieta. La síntesis de la urea se lleva a cabo en el hígado mediante el ciclo de la urea, y la cuarta parte de esta se metaboliza en el intestino para forma amoniaco y dióxido de carbono mediante la actividad de la flora bacteriana normal. La eliminación de la urea ocurre principalmente en el riñón filtrándose libremente a través del glomérulo. El deterioro de la función glomerular, por lo tanto, conduce a una elevación de los niveles de nitrógeno ureico en circulación, por lo que es un buen marcador de daño renal.

Para la determinación del BUN se utilizó un estuche comercial con un método colorimétrico de punto final, el cual es una adaptación de la reacción propuesta por Jung (Jung *et al.*, 1975). Este método consiste en la reacción de la urea con el ortoformaldehído en medio ácido donde se produce un complejo colorido que se lee a 510 nm (Fig. 12).

El estuche está formado por 2 reactivos, uno de ellos es el ortoformaldehído y el otro es una solución de borato, además de un estándar cuya concentración se toma de referencia para realizar el cálculo (técnica detallada en el apéndice 1).

El cálculo del BUN se hace utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{D.O. de la muestra} \times [\text{estándar}]}{\text{D.O. del estándar}} = \frac{[\text{muestra}]}{2.14}$$

Donde: D.O = densidad óptica,

[] = concentración en mg/dl

Nota: el 2.14 es el factor que se utiliza para convertir los mg/dl de urea en moléculas de nitrógeno.

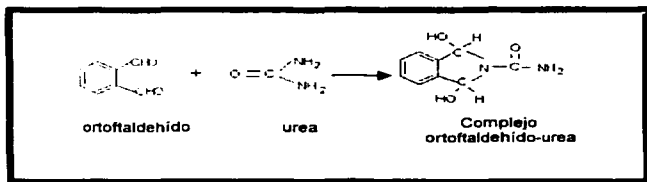


Fig. 13. Reacción entre la urea y el ortoformaldehído en medio ácido para producir un complejo colorido que absorbe a 510 nm.

5.1.2 Creatinina.

La creatinina es un producto de desecho formado en el músculo a partir de la creatina. La eliminación de la creatinina tiene lugar casi exclusivamente a través de la filtración glomerular, siendo un importante indicador de la función renal. La eliminación de la creatinina no es afectada por la diuresis, y su generación es independiente de la dieta alimenticia.

El método por el cual se midieron los niveles de creatinina se basa en la reacción Jaffé (Kroll *et al.*, 1987), en la cual la creatinina reacciona con una solución alcalina de picrato de sodio formando un complejo colorido (creatinina-picrato) cuya densidad óptica se mide a 505 nm (Fig. 13).

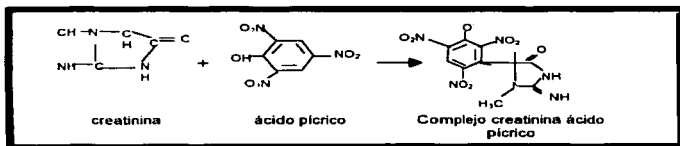


Fig.14. Reacción de Jaffé, donde se forma un complejo colorido creatinina- ácido pícrico.

Para realizar esta determinación se utilizó un estuche comercial que contiene un estándar que es una solución de creatinina con concentración conocida y 2 reactivos, uno de ellos es una solución de ácido picrico y el otro es una solución de hidróxido de sodio, los cuales son utilizados para hacer una mezcla reactiva. Este método es cinético por lo que se toman lecturas tanto de las muestras problemas como del estándar a una longitud de onda de 505 nm a los 30 (E_1), 60 y 90 (E_2) segundos (apéndice 2).

Para calcular la concentración de creatinina en mg/dl se aplica la siguiente fórmula:

$(E_2 - E_1)$ muestra / $(E_2 - E_1)$ estándar \times concentración del estándar = concentración de la muestra (mg/dl). Donde E_1 = D.O. a 30 segundos y E_2 = D.O. a los 90 segundos.

5.1.3 Estudios histológicos.

Para determinar el daño estructural renal generado por la CsA se realizaron preparaciones histológicas en cortes de 4 micras que se montaron en portaobjetos (apéndice 3). Estas preparaciones se tiñeron con hematoxilina/eosina (la hematoxilina tiñe material genético y la eosina tiñe proteínas en general) y se observaron con microscopía de luz.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.2 Actividad renal de las enzimas antioxidantes

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se realizó previamente un homogenizado de riñón. La muestra se homogenizó en una proporción 1:100 (0.1g de muestra de riñón en 1 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 y tritón X100 al 1%) (apéndice 4). Además, se determinó la concentración de proteínas totales en el homogenado por el método de Lowry (apéndice 5), para poder calcular la cantidad de proteínas colocadas en los ensayos enzimáticos y expresar los resultados como actividad específica (U/mg de proteína).

5.2.1 Actividad de GPx

La actividad de la GPx se midió de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (Fig. 14). La GPx, al reducir los hidroperóxidos oxida al glutatión reducido, el cual es regenerado por la glutatión reductasa, proceso que consume NADPH. Entonces, este método se basa en la disminución de la absorbencia a los 340 nm debido a la desaparición de NADPH (Harris, 1992; Ichikawa *et al.*, 1994) (Apéndice 6).



Fig. 15. Participación de GPx en la eliminación del H₂O₂.

La actividad de la glutatión peroxidasa se calcula promediando los cambios de absorbencia (A) por minuto durante cinco minutos, y multiplicando este promedio por 0.16. Para obtener este factor se parte de la ley de Lambert y Beer ($A = c \times r \times l$), tomando en cuenta que el coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm (ϵ) es de $6.22 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y la longitud de la celda utilizada (l) es de 1 cm. Finalmente, se divide este resultado entre los mg de proteína adicionados al ensayo. Así se obtiene la actividad de GPx expresada en U/mg de proteína, donde $1 \text{ U} = \mu\text{mol}$ de NADPH oxidado/min. La concentración de proteína en el homogenado se determina por el método de Lowry (mg/ml), y después se calcula la cantidad de proteínas colocadas en el ensayo considerando que se agregan 0.1 ml del homogenado diluido 1:10. Esto equivale a añadir 10 μl del homogenado sin diluir. Por lo tanto, se divide entre 100 el valor de concentración de proteínas totales (mg/ml) para obtener los mg de proteínas en esos 10 μl que se colocaron en el ensayo.

5.2.2 Actividad de SOD.

La actividad de la SOD se mide por la capacidad de esta enzima de evitar la reducción del azul de nitroazul de tetrazolio (NBT) por los aniones superóxido formados al actuar la xantina sobre la xantina oxidasa (Oberley & Spitz, 1984). Es decir, la mezcla de reacción utilizada en el ensayo contiene este sistema generador de iones superóxido y NBT, un reactivo que adquiere color cuando es reducido a formazán por los iones superóxido y el cual absorbe a 560 nm (Fig. 15). Entonces, en la mezcla de reacción habrá una competencia entre la SOD de la muestra y el NBT por los iones superóxido. La actividad de la SOD es directamente proporcional al grado de inhibición de la reducción del NBT. Por lo tanto, una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la reducción del NBT.

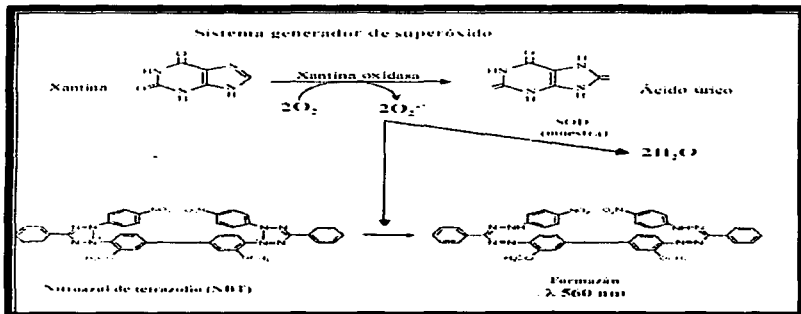


Fig. 16. Componentes de la mezcla de reacción para determinar la actividad de SOD, donde se observa la generación del ión superóxido, por el sistema xantina-xantina oxidasa, y la competencia de la SOD y el NBT por estos iones superóxido.

En esta determinación se utilizan tres tubos por muestra; uno de ellos es un blanco, al cual se le agrega mezcla de reacción, muestra y amortiguador de fosfatos, pero no se le agrega xantina oxidasa por lo que no hay fuente de generación de iones superóxido, y la reducción del NBT se debe a los componentes de la muestra. Los otros 2 tubos son los tubos problema y contienen mezcla de reacción, muestra y xantina oxidasa (técnica detallada en el apéndice 7). Además, al principio y al final del ensayo se colocan 2 tubos denominados 100% de reducción, a los cuales se les agrega mezcla de reacción, amortiguador de fosfatos y xantina oxidasa, pero no llevan muestra. Estos tubos

nos sirven como control, ya que al no ponerle muestra no hay SOD que impida que el NBT sea reducido por los iones superóxido y se produzca el formazán.

La actividad de la SOD total se calcula utilizando la siguiente fórmula: $U = B - y/b$, donde U = actividad de SOD en unidades; B = promedio de las densidades ópticas obtenidas en los tubos de 100% de reducción; y = promedio de la densidad óptica de los duplicados de la muestra menos el valor de la absorbencia de su respectivo blanco; y b = 50% de la reducción total (B+2).

Para el cálculo final es necesario corregir por los mg de proteína adicionados al ensayo para obtener la actividad específica. Una vez determinada la concentración de proteínas por el método de Lowry de una muestra del homogenado que se utilizó para las determinaciones, expresada en mg/ml (apéndice 5), se calcula la cantidad de proteínas adicionadas en el ensayo de la siguiente manera:

proteínas totales (mg/ml) x 0.33 ml colocados en el ensayo + la dilución de la muestra; en este caso la dilución de la muestra fue 1:100 por lo tanto:

$(\text{Proteínas totales} \times 0.33) / 100$

a) Mn-SOD

Esta técnica se basa en la inhibición o inactivación de la isoforma Cu,Zn-SOD por dietilditiocarbamato (DDC) de acuerdo al método de Iqbal y Whitney, 1991). Este compuesto es capaz de quelar a los iones metálicos (Cu^{2+} y Zn^{2+}) contenidos en la isoforma Cu,Zn-SOD, y de esta manera inactivarla. Sin embargo, el DDC puede interferir con la determinación de la actividad de Mn-SOD, ya que si este está en exceso puede interaccionar con el sistema generador de los iones superóxido y evitar que se lleve a cabo la reacción, por lo que es necesario dializar las muestras para eliminar el exceso de DDC (apéndice 7.1). En los cálculos que se realizan para obtener la actividad de Mn-SOD se sigue el procedimiento ya descrito para SOD total, solo que en este caso es necesario medir la concentración de proteínas totales en el dializado. Las proteínas del dializado se miden por el método de Lowry (mg/ml) (apéndice 5), y después se calcula la cantidad de proteínas adicionadas en el ensayo de la siguiente manera:

proteínas totales (mg/ml) x 0.33 ml colocados en el ensayo + la dilución de la muestra; en este caso la dilución de la muestra fue 1:2 durante el dializado con DDC y 1:50 antes de colocar la muestra en el ensayo, por lo tanto la dilución final fue 1:100. Entonces:

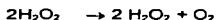
$(\text{Proteínas totales} \times 0.33) / 100$

Nota: Cuando se requiera hacer otras diluciones se deben de tener en cuenta de la misma manera en el cálculo final.

Para obtener la actividad de la Cu,Zn-SOD (U/mg prot) se tiene que restar la actividad de Mn-SOD a la actividad de la SOD total, y la diferencia corresponderá a la actividad de Cu,Zn-SOD.

5.2.3 Actividad de CAT

Esta se determinó por el método de Aebi (Aebi, 1984) que se fundamenta en la disminución de la concentración del H₂O₂, sustrato de la catalasa, el cual absorbe a 240 nm, por lo que su descomposición puede seguirse espectrofotométricamente.



La diferencia en la densidad óptica (ΔA_{240}) por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa (Aebi H, 1984). La descomposición del H₂O₂ sigue una cinética de primer orden (k) y puede calcularse usando la siguiente fórmula:

$$k = (1/t) (\ln [A_1/A_2])$$

Donde t = intervalo de tiempo medido; A₁ y A₂ = densidades ópticas de H₂O₂ en los tiempos t₁ y t₂.

Para un intervalo de 15 segundos se aplica la siguiente fórmula:

$$k = 0.0667 \times \ln [A_1/A_2]$$

Los resultados se expresan en k/mg de proteína, por lo tanto es necesario medir la concentración de proteínas totales en la muestra por el método de Lowry (técnica detallada en el apéndice 5) y después calcular la cantidad de proteína colocada en el ensayo para lo cual se divide la concentración de proteínas (mg/ml) entre 1200, que se obtiene de multiplicar 30 (dilución de la muestra en el ensayo) por 40 obtenido al dividir 1000 μ l/25 μ l con el objeto de convertir los 25 μ l que es el volumen de muestra en el ensayo a ml.

6. Análisis Estadístico.

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los datos se analizaron con el programa Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de Tuckey. La comparación del peso corporal y consumo de alimento del día en que se inició el tratamiento (D-0) y del día en que terminó (D-7) se realizó mediante una *t* de Student pareada. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS

1. Consumo de alimento

Como se ha reportado en la literatura (Bobadilla *et al.*, 1994; Mihatsch *et al.*, 1986) y observado previamente en nuestro laboratorio, las ratas tratadas con CsA disminuyen su consumo de alimento (t pareada D-0 Vs D-7 $p < 0.05$) (Fig. 17), razón por la cual se decidió alimentar a la par al resto de los grupos estudiados. Así, se observó el mismo comportamiento obteniendo valores similares entre todos los grupos en el día 7 cuando se realizaron las demás determinaciones (ANOVA de una vía $p > 0.05$). Aunque el grupo CsA+EAE muestra una disminución mayor del consumo de alimento que el resto de los grupos, esta disminución no es estadísticamente significativa.

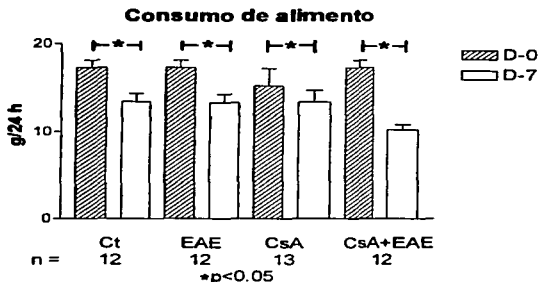


Fig. 17. Comportamiento del consumo de alimento en los cuatro grupos de estudio. Se grafica media \pm error estándar. Ct = grupo control; EAE = grupo, tratado con extracto de ajo envejecido; CsA = grupo, tratado con ciclosporina A; CsA+EAE = grupo, tratado con ciclosporina A + extracto de ajo envejecido.

2. Peso corporal

El peso corporal de los cuatro grupos de ratas en el día cero y en el día siete se presenta en la Fig. 18. Los cuatro grupos presentan una disminución de peso comparando el valor inicial (D-0) y el final (D-7) (t pareada $p < 0.05$), y en ambos días no hay diferencias entre los cuatro grupos (ANOVA de una vía $p > 0.05$), al igual que en el caso del consumo de alimento.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

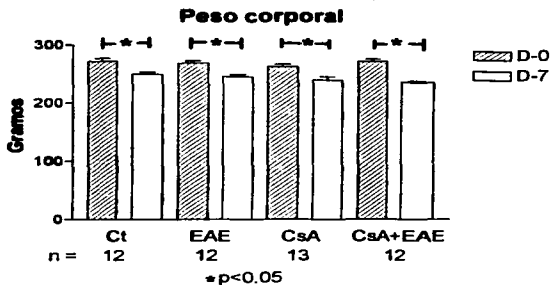


Fig. 18. Comportamiento del peso corporal en los cuatro grupos estudiados. Se grafica media \pm error estándar.

3. Determinaciones de daño renal

3.1 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

En la Fig. 19 podemos observar que el tratamiento con CsA induce un incremento de un 45.9% en el nivel del BUN con respecto a los valores del grupo control, demostrándose con esto el daño renal. Se observa una recuperación con el tratamiento con EAE, ya que hay diferencias significativas entre los grupos CsA y CsA+EAE; sin embargo, esta recuperación es parcial ya que aún hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo CsA+EAE (26.2 ± 0.9) y el grupo control (22.0 ± 0.7). El EAE *per se* no induce ningún efecto en el nivel del BUN.

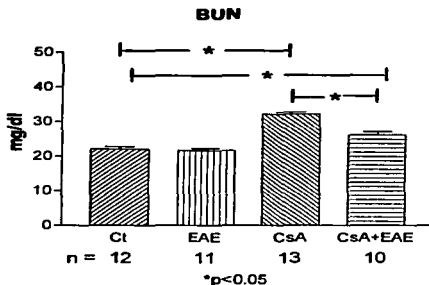


Fig. 19. Efecto de la ciclosporina A y del tratamiento con extracto de ajo envejecido en la concentración de nitrógeno de urea en sangre. ANOVA de una vía, Tukey. Se grafica media \pm error estándar.

3.2 Creatinina

En los valores obtenidos de creatinina en suero (Fig. 20) hay un incremento estadísticamente significativo del 26.5% en el grupo CsA con respecto al grupo control, lo que demuestra, junto con los valores de BUN, el daño renal inducido por el tratamiento con la CsA. El EAE *per se* no induce alteraciones en este marcador. Interesantemente, se podría decir que en el grupo tratado con CsA+EAE se previene totalmente el efecto de la CsA en los niveles de creatinina, ya que el grupo de CsA+EAE (0.78 ± 0.03) no presenta diferencias significativas con respecto al grupo control (0.73 ± 0.01) y sí presenta diferencias significativas con respecto al grupo de CsA (0.92 ± 0.05).

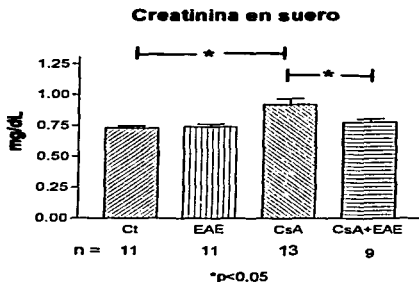


Fig. 20. Efecto de la Ciclosporina A y del extracto de ajo envejecido los niveles séricos de creatinina. ANOVA de una vía, Tuckey. Se grafica media \pm error estándar.

3.3 Estudio histológico

En la Fig. 21 se muestran imágenes representativas del análisis histológico en cada uno de los grupos estudiados. Las ratas control y las tratadas con ajo no presentan ningún tipo de alteración (Fig. 19A y 19B respectivamente). En la Fig. 19C se observa que el tratamiento con CsA indujo inflamación, vacuolización y necrosis en las células epiteliales de los túbulos proximales; en el caso de las ratas tratadas con CsA+EAE (Fig. 19D), puede verse una disminución del daño inducido por CsA.

**TESIS CON
LA DE ORIGEN**

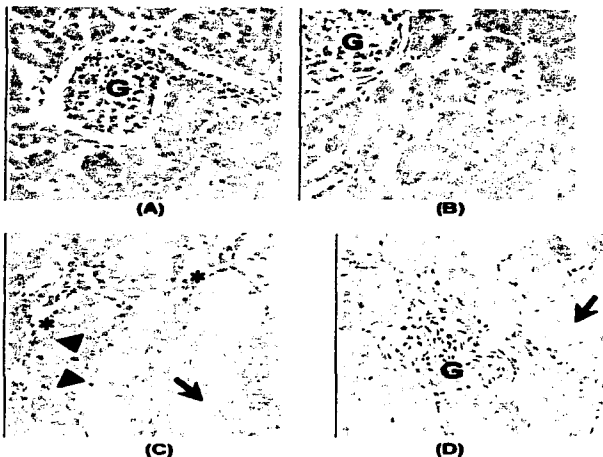


Fig. 21. Imágenes representativas del análisis histológico por microscopía de luz de cada uno de los grupos estudiados. Rata control (A), rata tratada con EAE (B), rata tratada con CSA (C) rata tratada con CSA+EAE (D). Tinción con hematoxilina-eosina, 200X. La G señala el glomérulo, el asterisco señala vacuolizaciones, las cabezas de flecha señalan inflamación y las flechas señalan *debris*.

4. Actividad renal de las enzimas antioxidantes

4.1 Superóxido dismutasa (SOD)

En la Fig. 22 se observa que la actividad de la SOD total en el tejido renal no presenta diferencias significativas entre los grupos estudiados. De la misma manera, cuando se determinaron las actividades de Mn-SOD y Cu,Zn-SOD, y no se encontraron alteraciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

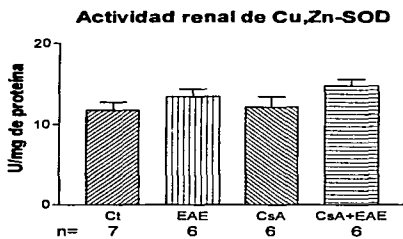
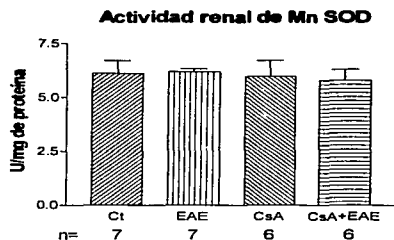
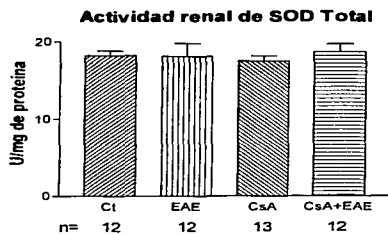


Fig. 22. Actividad renal de la superóxido dismutasa total, Mn-SOD y Cu-Zn-SOD en los cuatro grupos estudiados. ANOVA de una vía, Tukey, se grafica media \pm error estándar, p = no significativa.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.2 Catalasa (CAT)

La actividad de CAT se muestra en la Fig. 23. Aquí se puede observar que no hay diferencias significativas entre los cuatro grupos estudiados, aunque en los grupos de CsA y CsA+EAE se ve una tendencia a disminuir.

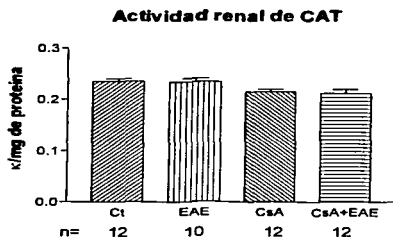


Fig. 23. Actividad renal de catalasa en los cuatro grupos de estudio. ANOVA de una vía, Tukey. Se grafica media \pm error estándar $p =$ no significativa.

4.3 Glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx en riñón se muestra en la Fig. 24, donde se puede observar que el grupo CsA presenta una disminución significativa de la actividad de la enzima de un 23.25% con respecto al grupo control. Esta disminución es revertida parcialmente por el tratamiento con EAE, ya que el grupo CsA+EAE (0.11 ± 0.008) no es diferente del grupo control (0.13 ± 0.008) pero tampoco es diferente del grupo CsA. El EAE solo no tuvo efecto sobre la actividad de esta enzima.

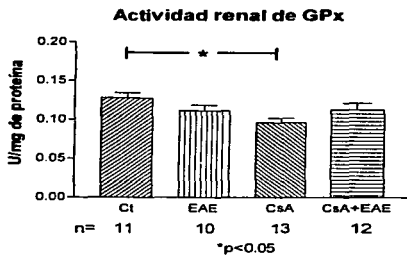


Fig. 24. Actividad renal de glutatión peroxidasa en los grupos de estudio. ANOVA de una vía. Tukey. Se gráfica la media ± error estándar.

VII. DISCUSIÓN

La CsA es un medicamento inmunosupresor ampliamente utilizado en la prevención del rechazo de órganos trasplantados, así como también es efectivo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes; sin embargo, bajo ciertas condiciones este medicamento causa serios efectos nefro y hepatotóxicos (Ahmed *et al.*, 1995; Adhirai & Selvam, 1998; Inselman *et al.*, 1994; Mathieson, 2000; Remuzzi & Norberto, 1995; Romano 2000). El mecanismo por el cual, la CsA induce la nefrotoxicidad no está claro, sin embargo existen evidencias que apoyan la participación de EROs (Campistol *et al.*, 2000; Inselman *et al.*, 1998; Pérez de Lema *et al.*, 1998; Sharon *et al.*, 1995;; Walter *et al.*, 1990), por lo que se exploró la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD (total, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD) y GPx en el riñón de ratas tratadas con CsA. Además, se utilizó EAE como antioxidante para ver si este evitaba o disminuía el daño renal y si esto era por cambios en las enzimas antioxidantes.

La CsA puede causar dos tipos de nefrotoxicidad: a) nefrotoxicidad aguda y b) nefrotoxicidad crónica (Campistol *et al.*, 2000). El presente trabajo experimental se orientó a la primera de ellas, la cual se genera en corto tiempo y es reversible. Nuestro interés en la insuficiencia renal aguda se debe a que si esta se detecta a tiempo se puede evitar que progrese a la fase crónica, la cual ya es irreversible. Para poder realizar este estudio fue necesario establecer previamente las condiciones para la inducción del daño renal. Para lograr esto, se realizaron varias pruebas piloto donde se probaron diferentes dosis y vías de administración de la CsA, así como algunos grupos de ratas fueron nefrectomizados y otros no: todas estas pruebas fueron realizadas hasta establecer y demostrar el daño renal.

Como se describe en los resultados, en las ratas tratadas con CsA el consumo de alimento disminuye significativamente por lo que éstas bajan de peso, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura (Ferguson *et al.*, 1993; Bobadilla *et al.*, 1994,1998; Mihatsch, 1986). Por esta razón los demás grupos fueron alimentados a la par, obteniendo un comportamiento similar entre los grupos, tanto en el consumo de alimento como el peso corporal. Esto es muy importante, ya que los marcadores de daño renal (creatinina y BUN) pueden presentar algunas alteraciones bajo ciertos estados fisiológicos. Los niveles séricos de creatinina pueden variar dependiendo de la masa muscular del organismo, ya que esta es el producto final del metabolismo de la creatina, que es una molécula que el músculo utiliza como reserva de energía, por lo que la producción de creatinina será proporcional a la masa muscular del organismo. Por otra parte, el BUN varía con la dieta, ya que es el producto final del catabolismo de los aminoácidos, por lo que los niveles de este se verán afectados por la cantidad de aminoácidos ingeridos en la dieta. Entonces, para que los resultados de estas determinaciones (creatinina y BUN) fueran perfectamente comparables entre los grupos estudiados, era necesario asegurarse de que no hubiera diferencias de ingesta de alimento o de peso corporal

entre ellos. Otro aspecto importante de que todos los grupos ingirieran la misma cantidad de alimento, es que el alimento utilizado en la dieta contiene antioxidantes no enzimáticos como vitaminas A y E, y si los grupos estudiados no ingieren la misma cantidad del alimento, los resultados obtenidos podrían no ser comparables, sobre todo en el caso de la actividad de las enzimas antioxidantes. Por todo esto es importante aclarar que los resultados que se obtienen en este estudio se deben exclusivamente al tratamiento realizado y no se deben a variaciones en la dieta y/o el peso corporal.

El incremento de los niveles de BUN y creatinina sérica y la presencia de daño histológico son pruebas del establecimiento del daño renal, es decir, se logró establecer la IRA inducida por CsA. Los valores obtenidos para la creatinina sérica y BUN son consistentes con los datos obtenidos por otros autores (Clarke *et al.*, 1999; Kumano *et al.*, 1989; Tariq *et al.*, 1999; Zima *et al.*, 1997). La explicación para la elevación del BUN y creatinina sérica es que la administración de la CsA causa vasoconstricción de las arteriolas eferentes (Ferguson *et al.*, 1993; Mathieson, 2000; Nagasawa & Ehara, 2000), lo que resulta en una disminución en el flujo sanguíneo y por lo tanto una disminución de la filtración por parte del glomérulo, y todo esto provoca un aumento en el nivel de BUN y de la creatinina sérica.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observa una protección por parte del antioxidante utilizado (EAE), ya que el aumento en los niveles de BUN y creatinina observados en el grupo con CsA se previene o disminuye con la administración de este antioxidante, así como el daño renal observado en el análisis histológico. Estos resultados son una evidencia más de que las EROs están involucradas en el desarrollo del daño renal inducido por CsA, lo cual está ampliamente documentado en la literatura (Ahmed *et al.*, 1995; Al Khader *et al.*, 1996; Inselman *et al.*, 1998; Kumano *et al.*, 1989; Pérez de Lema *et al.*, 1998; Serino *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1995). Además, nuestras observaciones coinciden con las de otros autores que utilizando otros antioxidantes encontrando una disminución del daño renal inducido por CsA; por ejemplo, Wang y Salahudeen (1995) y Kanji *et al.* (1999) con vitamina E, Al Khader *et al.* (1996) con quinacrina, Tariq *et al.* (1999) con *N*-acetil-cisteína, y Zhong *et al.* (1998) con glicina.

Por otro lado, en otros modelos de daño renal donde están involucradas las EROs como es el caso de la gentamicina, el tratamiento con una dieta de ajo confiere protección (Pedraza *et al.*, 2000) y estos autores concluyen que este efecto protector puede deberse a las propiedades antioxidantes del ajo, las cuales evitan probablemente el aumento de las EROs. Una explicación que se ha propuesto de cómo las EROs pueden inducir la IRA, es que se ha demostrado que el H₂O₂ induce contracción de las células presentes en el glomérulo, disminuyendo de esta manera la velocidad de filtración

glomerular; por lo tanto, es probable que la protección por EAE observada en este modelo de IRA por CsA sea, al menos en parte, a través de la capacidad del EAE de disminuir la producción de H_2O_2 , ya que existen evidencias que sugieren que la CsA aumenta la generación de H_2O_2 *in vitro* (Pérez de Lema *et al.*, 1998; Parra *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1994a, 1994b) e *in vivo* (Zhong *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 1995; Serino *et al.*, 1993) y que hay una vasoconstricción del glomérulo en la IRA por CsA (Ferguson *et al.*, 1993; Mathieson, 2000; Nagasawa & Ehara, 2000).

Con respecto al comportamiento de las enzimas antioxidantes, en este trabajo se encontró que la actividad renal de las SODs no presenta diferencias significativas entre los grupos estudiados. Otros autores han encontrado comportamientos diferentes de la actividad de esta enzima. Por ejemplo, Cristof *et al.* (1998) encontraron una disminución en eritrocitos de pacientes tratados con CsA, en cambio, Zima *et al.* (1997) encontraron un aumento en la actividad de SOD total en eritrocitos de ratas Wistar tratadas con el fármaco. Asimismo, Mun (2000) reportó una disminución tanto de CAT como de SOD y un aumento de GPx en el plasma de ratas Sprague Dawley. Todo esto indica que el comportamiento de esta enzima varía dependiendo del tejido, el tratamiento, el tipo de organismo, etc. Lo que sí es consistente es que el aumento en la actividad de esta enzima (SOD), ya sea por la introducción del gen (Zhong *et al.*, 2001) o por la inyección de la enzima (Wolf *et al.*, 1994a), induce una disminución del daño renal por CsA, y parece que en este efecto benéfico está implicada la inhibición significativa de la vasoconstricción inducida por CsA (Wolf *et al.*, 1994a).

En cuanto a la actividad de CAT, hay una disminución estadísticamente significativa solo en el grupo tratado con CsA+ EAE, sin embargo, los grupos CsA y CsA+EAE presentan una tendencia a disminuir. Existen otros modelos de estrés oxidativo en donde también se ha observado una disminución de la actividad de esta enzima como la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio (observaciones de nuestro laboratorio aún no publicadas), la IRA inducida por isquemia y reperusión (Singh *et al.* 1993), o la nefrotoxicidad por gentamicina (Pedraza *et al.* 2000), donde tampoco una dieta al 2% de ajo pudo revertir esta disminución.

La disminución observada en la actividad renal de GPx en el grupo con CsA puede deberse a un aumento en la producción del $O_2^{\cdot -}$, ya que se ha demostrado la generación de este radical por la CsA (Pérez de Lema *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1994a) y hay evidencias de que este inactiva a la GPx (Blum & Fridovich, 1985). Por otro lado, también se ha demostrado que la CsA induce una disminución de la relación GSH/GSSG, lo que, a su vez, puede disminuir la actividad de la GPx. En cuanto al efecto del EAE, se observó que este revierte parcialmente la disminución de la actividad renal de GPx, lo cual podría deberse a la capacidad del EAE de atrapar EROs (Ide *et al.*, 1996), o bien de aumentar los

actividad de GPx, así como de SOD y CAT, en células del endotelio vascular tratadas con EAE *in vitro* (Wei *et al.*, 1998).

Con base en todos estos resultados, se puede decir que hay una respuesta diferencial de las enzimas antioxidantes estudiadas, y que la disminución en la actividad de GPx puede ser responsable, al menos en parte, del desarrollo de la IRA inducida por CsA, ya que esto puede traer por consecuencia que aumente el estrés oxidativo, además de que el tratamiento con EAE disminuye el daño renal así como los efectos de la CsA sobre la GPx. Por otro lado, se puede decir que la protección inducida por el EAE puede deberse, directa o indirectamente, por su efecto sobre la GPx.

VIII. CONCLUSIONES

1. Hay una respuesta diferencial de la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas en el daño renal inducido por CsA, y la disminución de la actividad renal de GPx podría tener algún papel en el desarrollo del daño renal.
2. El EAE disminuye el daño renal inducido por CsA y esto puede deberse, al menos en parte, a su efecto sobre la actividad de GPx.

IX. APÉNDICES

En esta sección están descritas las técnicas como se montaron en el presente trabajo. En el capítulo "material y métodos" está el fundamento teórico y el procedimiento para calcular los resultados de cada una.

APÉNDICE 1

Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

Para realizar esta determinación se utilizó un estuche comercial (Spinreact # cat 10013254).

Los reactivos utilizados son los siguientes:

Reactivo 1	Ortoftaldehído	4.8 mmol/L
Reactivo 2	Solución borato	87 mmol/L
Estándar	Solución urea	50 mmol/dL

La técnica utilizada para esta determinación es de punto final y los reactivos se colocan de la siguiente manera:

	Blanco	Estándar	Muestra
Muestra	---	---	10 µL
Reactivo 1	400 µl	400 µl	400µl
Estándar	---	10 µl	---

Añadir a todos los tubos 400 µl, del reactivo 2 cada 30 o 60 segundos dependiendo de la habilidad de cada persona para leer los tubos al finalizar el tiempo de incubación, mezclar por inversión rápidamente e inmediatamente incubar a 37°C durante 15 min.

Se lee en el espectrofotómetro a 510 nm calibrando a cero con el blanco.

APÉNDICE 2

Creatinina en suero

Para realizar esta determinación se utilizó un estuche comercial (Spinreact # cat 1001111)

Los reactivos utilizados son los siguientes:

Reactivo 1	Ácido pícrico	17.5 mmol/L
Reactivo 2	Hidróxido de sodio	0.29 mol/L
Estándar	Creatinina	2.0 mg/dL

Para poder realizar esta determinación se prepara una mezcla reactiva, de la siguiente manera: Se mezclan los reactivos 1 y 2 en una proporción 1:1 y la cantidad de la mezcla a preparar se calcula tomando en cuenta el número de muestras que se procesan, el estándar y el blanco, considerando que por cada tubo se utilizan 0.5 ml. La solución es estable por 10 días a temperatura ambiente.

Los reactivos se adicionan de la siguiente manera:

	Blanco	Estándar	Muestra
Suero u orina	---	---	50 μ L
Estándar	---	50 μ L	---
Mezcla reactiva	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Agua	50 μ L	---	---

Es una técnica cinética por lo que se hacen las determinaciones individualmente. En un tubo se colocan el estándar o la muestra y se adicionan a la mezcla reactiva, se mezcla perfectamente con el vortex lo más rápido posible, se vierte rápidamente a la celdilla hechando a andar al mismo tiempo las lecturas en el espectrofotómetro y se toman las lecturas de D.O. a 492 nm a los 30 (E1), 60 y 90 (E2) segundos.

APÉNDICE 3

Histología

Para realizar esta técnica se utilizaron los siguientes reactivos

Etanol	Acido clorhídrico 1%
Xilol	Cloruro de litio
Parafina	Resina
Silano	Hematoxilina eosina

Para deshidratar y teñir los cortes de riñón se siguieron los pasos que a continuación se describen:

A) La muestra se incluye de la siguiente forma:

1. Se trata la muestra con etanol al 100%, durante una hora, y se hacen tres cambios.
2. Enseguida, se trata con xilol al 100%, durante una hora, también tres veces.
3. Se funde la parafina y la muestra se trata en ella durante una hora también por tres veces.
4. Se coloca la muestra en la parafina definitiva y se deja enfriar.

B) Una vez incluida la muestra, se procede a realizar los cortes:

1. Se dejan enfriar los bloques.
2. Se corta el bloque con un microtomo en rebanadas con un espesor de 3-5 400 μm .
3. Se mete los cortes a un baño de agua a 37°C para extender la muestra.
4. Se coloca el corte en el portaobjetos, que ha sido pretatado con silano.
5. Se introduce al horno para evaporar residuos de agua y fundir parcialmente la parafina.

C) Se procede a realizar la tinción hematoxilina/eosina:

1. La muestra se desparafina pasándola por diferentes baños de xilol y xilol-etanol.
2. Se rehidrata nuevamente la muestra tratándola con etanol al 100%, 96%, 70% y agua.
3. Se tiñe la muestra hematoxilina de 2-10 minutos, e inmediatamente después se lava con agua y luego con alcohol-ácido (ácido clorhídrico al 1% en etanol al 70%).
4. Se vira la hematoxilina con cloruro de litio y se lava con agua.
5. Se tiñe con eosina y se lava con etanol.

D) Finalmente, se monta la muestra para poderla observar al microscopio de la siguiente forma:

1. Se deshidrata nuevamente, pasando la muestra por diferentes baños con etanol al 70%, 96%, 100%, xilol-etanol y, por último, dos baños de xilol.
3. Se adiciona dos gotas de resina sin dejar secar el xilol y se coloca el cubreobjetos.

APÉNDICE 4

Homogenización de riñón para la determinación de las enzimas antioxidantes GPx, SOD y CAT

Los reactivos utilizados son los siguientes:

Reactivos	Catálogo	Almacenamiento	PM
KH_2PO_4	Baker 3246-01	Temp. ambiente	136.09 g
Na_2HPO_4	Baker 3828-05	Temp. ambiente	141.96 g
Tritón X-100	Sigma, X-100	Temp. ambiente	-----

Para poder realizar esta homogenización se requiere un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y Tritón al 1%. Este puede ser preparado días antes del ensayo.

Amortiguador de homogenización:

Reactivos	250 ml	1000 ml
KH_2PO_4	1.0522 g	4.209 g
Na_2HPO_4	0.677	2.707 g
Tritón X-100	2.5 ml	10 ml

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH sólido.

Para la homogenización se utilizan tubos de plástico de 12 x 75 mm que se colocan en una gradilla dentro de una charola con hielo. Se coloca 1 ml de amortiguador en cada tubo y se pesan 0.1 g del tejido correspondiente.

Para homogenizar se usa el 'politrón' (KINEMATICA, Suiza, modelo PT2000) colocando la perilla de las velocidades en 1 o en 2 (tejidos blandos). Se coloca la cuchilla (KINEMATICA PTA-7) hasta el fondo del tubo que contiene el tejido. Evitar que la cuchilla gire en seco. Se homogeniza durante 15-20 segundos moviendo el tubo de plástico levemente de abajo hacia arriba de manera continua y girándolo. Tratar de escurrir la cuchilla lo más posible. Se revisa el contenido del tubo para asegurarse de que no haya aún algún pedazo de tejido; de haberlo, se homogeniza nuevamente. Entre cada homogenización, se lava la cuchilla con un chorro de agua destilada empleando una piseta y se seca el exceso de agua con una toalla de papel. Después, se procede a homogenizar el siguiente tejido (se repite el procedimiento).

Al finalizar la homogenización de todos los tejidos, se lava perfectamente la cuchilla: además de enjuagarla como se indicó anteriormente, se hace funcionar el 'politrón' pero usando ahora tubos que contienen solamente agua destilada. La cuchilla estará limpia cuando el agua donde se enjuagó la cuchilla ya no muestre partículas suspendidas.

Posteriormente el homogenado se transfiere a tubos eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetados o numerados. Las muestras se centrifugan a 1000 rpm durante 1h a 4°C y del sobrenadante obtenido se hacen alícuotas de 333 μl perfectamente etiquetadas que se guardan a -20, -40 o -80°C hasta su uso.

APÉNDICE 5.

Proteínas totales por método de Lowry.

Los reactivos utilizados son los siguientes:

Reactivos:	No.Cat	PM
Na ₂ CO ₃	JTBaker 3604-01	106
NaOH	JTBaker 3722-01	40
Tartrato de sodio y potasio KNaC ₄ H ₄	Mallinckrodt 2376	-----
CuSO ₄ .5H ₂ O	JTBaker 1843	249.68
Reactivo de Folin & Ciocalteu's phenol	Sigma F-9252	-----
Albúmina sérica bovina	Sigma A4503	-----

Soluciones:

-Albúmina sérica bovina (ASB):

Albúmina sérica bovina al 0.05% (50 mg en 100 ml de H₂O destilada).

-Solución A:

Na₂CO₃ al 2% (20 g en 1000 ml)

NaOH al 0.4% (4 g en 1000 ml)

Tartrato de sodio al 0.02% (0.2 g en 1000 ml)

Almacenar a temperatura ambiente.

-Solución B:

CuSO₄ al 0.5% (0.5 g en 100 ml)

Almacenar a temperatura ambiente.

-Solución C (Se prepara al momento del ensayo):

	25 tubos	50 tubos
Solución A	25 ml	50 ml
Solución B	0.5 ml	1 ml

-Solución D (Se prepara al momento del ensayo):

Folin 1 N (diluir el folin 2.0 N 1:2 con H₂O destilada)

Preparación de las muestras:

Homogenizar el tejido (la relación p/v y el amortiguador a usar dependen de la medición a realizar).

MUESTRA	Dilución del sobrenadante del homogenado (p/v)	Dilución necesaria
Orina ó suero	-----	1:10
Tejido de riñón	1:80. (12.5 µl + 987.5 µl de agua)	-----

Generalmente las diluciones de las muestras se hacen con agua y en tubos de 12x75 mm.

Procedimiento:

Preparar una curva estándar con albúmina sérica bovina al 0.05%.

[ASB]µg/0.2 ml	ASB (µl) 0.05%	H ₂ O (µl)
Blanco	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
25	50	150
35	70	130
50	100	100

Se numeran tubos de 12x75 mm o 13x100 mm (las determinaciones se hacen por duplicado , también las muestras de la curva patrón).

Se colocan en cada tubo 0.2 ml de la dilución correspondiente.

Se añade a todos los tubos 1 ml de sol. C incluyendo los tubos de la curva estándar (usar la micropipeta de repetición ya que ahorra mucho tiempo).

Se agitan y se incuban 10 min.

Se añaden a todos los tubos añadir 100 µl de sol. D con agitación simultánea (usar la micropipeta de repetición ya que ahorra mucho tiempo).

Se incuban 30 min.

Se lee a 660 nm calibrando a cero con el blanco

En el espectrofotómetro PERKIN ELMER (lambda Bio-10), la aplicación **44 (CALIBRATION CONCENTRATION)** permite obtener la concentración real de proteínas en la muestra al introducir parámetros como longitud de onda y el factor de corrección, el cual depende de la dilución que le haya realizado a la muestra. Por ejemplo si la dilución es 1:100, el factor de corrección es 0.5: Se multiplica x 5 para pasar de $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ a $\mu\text{g}/\text{ml}$ (se usan 200 μl de muestra en el ensayo), se multiplica por la dilución de la muestra (lo que permite conocer la concentración real de la proteína en $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se divide entre 1000 (para pasar de $\mu\text{g}/\text{ml}$ a mg/ml).

En la siguiente tabla se dan algunos ejemplos:

Pasar de 0.2 ml a ml		dilución		Pasar de μg a mg		FACTOR DE CORRECCIÓN
5	x	100	+	1000	=	0.5
5	x	150	+	1000	=	0.75
5	x	200	+	1000	=	1.0

En el espectrofotómetro BECKMAN DU-600 se usa la aplicación de PROTEIN CONCENTRATION, método LOWRY, y se introduce el factor de corrección correspondiente.

A continuación un ejemplo de las lecturas de los valores de la curva patrón.

$\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$	D.O. a 660nm.
5	0.0740
10	0.1210
15	0.1740
25	0.2660
35	0.3630
50	0.5040

APÉNDICE 6

Actividad de Glutación peroxidasa (GPx)

Los reactivos utilizados en esta técnica son los siguientes:

Reactivos:	# Cat	PM
EDTA-Na ₂	JTBaker 8993	372.252
Azida de sodio	Merck 822335	65.01
NADPH	Sigma N-1630	833.4
Glutación reductasa	Sigma G-4751	-
Glutación reducido	Sigma G-6529 ó G-4251	307.3
Peróxido de hidrógeno	Mallinckrodt 5240	34.01

Para llevar a cabo esta técnica se debe preparar una mezcla de reacción. A continuación se muestran las cantidades de los diferentes reactivos que hay que adicionar dependiendo de la cantidad de mezcla a preparar que, a su vez, depende del número de muestras que se vayan a determinar ya que se necesitan agregar 800 µL de mezcla de reacción por muestra. Una vez preparada la mezcla de reacción se mantiene en hielo durante el ensayo.

	25 mL (31 tubos)	32 mL (40 tubos)	50 mL (62 tubos)	Conc. final
EDTANa ₂	0.0093 g	0.0119 g	0.0186 g	1 mM
Azida de sodio	0.00165 g	0.0021 g	0.0033 g	1 mM
NADPH	0.00415 g	0.0065 g	0.0083 g	0.2 mM
Glutación reducido	0.0077 g	0.0098 g	0.0154 g	1 mM
Glutación reductasa	♣	♣	♣	♣
Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0	cbp 25 mL	cbp 32 mL	cbp 50 mL	

Preparar y usar el mismo día del ensayo.

♣ La cantidad de glutación reductasa a añadir a la mezcla de reacción depende del número de muestras y del # de lote de esta enzima. Para saber la cantidad de enzima que se debe de agregar, se debe de tener en cuenta que la concentración final en la mezcla debe de ser 1 U/ml y que cada lote de glutación reductasa tiene una actividad específica diferente. Por ejemplo, para un lote se tienen 9.2 mg de prot/ml y 170 U/mg prot, y para preparar 15 ml se necesitan 15 U, entonces el cálculo se realiza de la siguiente forma:

$$15 \text{ U} \times \frac{1 \text{ mg prot}}{170 \text{ U}} \times \frac{1 \text{ ml}}{9.2 \text{ mg}} = 0.0096 \text{ ml} \text{ o } 9.6 \text{ } \mu\text{L} \text{ de enzima para agregar a la mezcla de reacción}$$

Por otro lado, se prepara la solución sustrato de la siguiente manera:

Se colocan 10 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 + 2 µl de H₂O₂ al 30%. Este volumen de 10 ml es suficiente para 100 tubos (0.1 ml/tubo). La solución se prepara antes de comenzar el ensayo y se mantiene a temperatura ambiente durante el mismo.

Procedimiento:

-La muestra del homogenado de riñón (técnica detallada en el apéndice 4), se diluye 1:8 (10 µl de sobrenadante de homogenado + 700 µl de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0)

-Blanco: amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 (para calibrar a cero)

-Actividad inespecífica: Se adicionan 100 µl de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 y 800 µl de la mezcla de reacción, se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente. Se adiciona todo el volumen a una celdilla que contiene 100 µl de la solución sustrato y se inicia el registro de la densidad óptica a 340 nm durante 3 minutos a intervalos de 1 min.

-Muestras: Se colocan en una celdilla 100 µl de muestra diluida 1:30 (se colocan 25 µl de sobrenadante de homogenado + 725 µl de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0) y 800 µl de la mezcla de reacción en otro tubo, se incuban 5 minutos a temperatura ambiente. Se vacía por inversión a una celdilla que contiene 100 µl de la solución sustrato y se inicia el registro de la de la densidad óptica a 340 nm durante 5 minutos a intervalos de 1min.

APÉNDICE 7

Actividad de superóxido dismutasa (SOD).

Los reactivos utilizados en esta determinación son los siguientes:

Reactivo	Catálogo	PM
Xantina oxidasa	Sigma X-0626	152.1
EDTANa ₂	JTBaker 8993	372.3
Nitroazul de tetrazolio	Sigma N-6876	817.6
Na ₂ CO ₃	Mallinckrodt. 7527	106.99
Albumina bovina	Sigma A-4503	
Sulfato de amonio	JTBaker 0792-01	132.14
CuCl ₂ ·2H ₂ O	JTBaker1792-01	170.5
Xantina oxidasa (EC 1.1.3.22).	Sigma X-4376	

Soluciones contenidas en la mezcla de reacción:

Xantina 0.3 mM.

Se calientan 900 ml de agua y se le agregan 0.0456 g de xantina. Se disuelve completamente la xantina calentando (sin llegar a ebullición), con agitación y protegida de la luz con papel aluminio. Este proceso de disolución tarda aproximadamente 3 horas. Una vez disuelta la xantina se afora a 1000 con agua. Se guarda en frasco ámbar de vidrio a temperatura ambiente.

NOTA: Poner la fecha en la que se prepara y descartar después de una semana.

EDTA 0.6 mM.

Se pesan 0.1118 g de EDTA y se disuelven en 450 ml con agitación. Se afora a 500 ml de agua. Se guarda a 4°C.

Nitroazul de tetrazollo (NBT) 150 µM. Se pesan 0.0368 g de NBT y se disuelven en 300 ml de agua con agitación. Se guarda a 4°C en frasco ámbar de vidrio.

Na₂CO₃ 400 mM

Se pesan 21.2 g de Na₂CO₃ y se disuelven en 450 ml de agua con agitación. Se afora a 500 ml con agua. Se guarda en refrigeración.

Albúmina 0.1 %.

Se pesan 0.25 g de albúmina y se disuelven en 250 ml de agua procurando que no se forme espuma. Se guarda en refrigeración.

Sulfato de amonio 2M.

Se pesan 66 g del sulfato de amonio y se disuelven en 200 ml de agua. Se afora a 250 ml. Se guarda en refrigeración.

CuCl₂·2H₂O 0.8 mM.

Se pesan 0.070 g de CuCl₂·2H₂O y se disuelven en 450 ml de agua con agitación. Se afora a 500 ml. Se guarda en refrigeración.

Xantina oxidasa (168 U/L) (disuelta en agua destilada). **NO HAY QUE ABRIR EL FRASCO DE XANTINA OXIDASA ENSEGUIDA DE SACARLO DEL REFRIGERADOR SINO HASTA QUE ESTÉ A TEMPERATURA AMBIENTE.**

La cantidad de xantina oxidasa depende del número de muestras y del número de lote, ya que la cantidad de unidades por mg de sólido es diferente en cada lote.

Por ejemplo, para preparar 2 ml (suficiente para 60 tubos) de un lote con 0.16 U/mg de sólido necesita 2.1 mg de xantina oxidasa:

Se necesitarán

0.16 U - 1 mg

1050 mg - 1000 ml

168 U - x mg

x mg - 2 ml

x = 1050 mg

x = 2.1 mg

Así entonces, para este número de lote en particular, hay que disolver 2.1 mg de xantina oxidasa en 2 ml de sulfato de amonio.

Para calcular el volumen necesario se debe considerar que se ocupan 33 μ l /tubo. En el siguiente cuadro se dan algunos ejemplos tomando en cuenta el lote del ejemplo anterior.

Xantina oxidasa	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	# tubos (33 μ l /tubo)
2.1 mg	2.0 ml	61
2.65 mg	2.5 ml	75
3.15 mg	3.0 ml	90
4.2 mg	4.0 ml	120

Se prepara el mismo día de uso y se conserva en refrigeración

Mezcla de reacción que se prepara el mismo día del ensayo.

# Tubos (cada muestra genera 3 tubos)	45 tubos	60 tubos	75 tubos	90 tubos	105 tubos	135 tubos
Xantina 0.3 mM	30 ml	40 ml	50 ml	60 ml	70 ml	90 ml
EDTA 0.6 mM	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	35 ml	45 ml
NBT 150 mM	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	35 ml	45 ml
Na_2CO_3 400 mM	9 ml	12 ml	15 ml	18 ml	21 ml	27 ml
Albumina 0.1%	4.5 ml	6 ml	7.5 ml	9 ml	10.5 ml	13.5 ml
TOTAL (ml)	73.5 ml	98 ml	122.5 ml	147 ml	171.5 ml	220.5 ml

Muestra.

Las diluciones de las muestras se hacen con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 en un volumen final de 1.5 ml de la siguiente manera:

SOD TOTAL (riñón completo): diluir la muestra 1:100

(15 μ l de sobrenadante del homogenado (el cual se describe en el apéndice 4) + 1485 μ l de amortiguador).

Procedimiento:

Encender el baño María a 27°C.

Alistar un cronómetro o 'timer'.

Cada muestra genera 3 tubos: 1 tubo blanco y 2 tubos problema. Además se colocan 4 tubos adicionales: 2 al principio de la serie y 2 al final de la misma que serán los tubos del 100% de reducción. Entonces se debe de preparar una serie de tubos de vidrio de 13 x 100 mm en una gradilla de metal dejando libres los primeros 4 lugares para que al ir agregando los reactivos los tubos se recorran un lugar. La siguiente figura representa una gradilla vista desde arriba e ilustra el orden de los tubos para el ensayo:

P7'	P8'	Pn'	100%							
P7	P8	Pn	100%							
B7	B8	Bn								
				100%	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'
				100%	P1	P2	P3	P4	P5	P6
					B1	B2	B3	B4	B5	B6

100% = Tubo 100% de reducción;

B = Blanco de muestra

P = Problema de muestra

' = Duplicado de problema de muestra

No. = número de muestra

Se debe tener preparadas 2 micropipetas de 200 μ l para despachar 33 μ l (1 para xantina oxidasa y otra para amortiguador) y 1 micropipeta de 1 ml para despachar 330 μ l (muestra o amortiguador) y 660 μ l de CuCl_2 .

Se adicionan 1.66 ml de mezcla de reacción con la pipeta de repetición a todos los tubos

Cada determinado lapso de tiempo (10, 15 ó 20 segundos) deben adicionarse los 330 μ l de amortiguador o de muestra (para tubos de 100% y tubos problema respectivamente) y enseguida los 33 μ l de amortiguador o de xantina oxidasa (tubo blanco de muestra o tubo problema de muestra respectivamente).

Lo ideal es que otra persona auxilie en este procedimiento colocando la muestra, o la xantina oxidasa y el amortiguador.

Si se elige por ejemplo un intervalo de 15 segundos el procedimiento es el siguiente agitando en vortex siempre después de la adición del segundo reactivo:

(Tiempo cero segundos) Tubo #1 de 100%

330 μ l de amortiguador

33 μ l de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo #2 de 100%

330 μ l de amortiguador

33 μ l de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo blanco de muestra 1 (B1)

330 μ l de muestra

33 μ l de amortiguador

(15 segundos después) Tubo problema de muestra 1 (P1)

330 μ l de muestra

33 μ l de xantina oxidasa

(15 segundos después) Tubo problema' de muestra 1 (P1')

330 μ l de muestra

33 μ l de xantina oxidasa

Y así sucesivamente.

El tiempo total de incubación será de 15 minutos, por lo tanto el número máximo para un intervalo de 15 segundos será de 60 tubos

Intervalo	# máximo de tubos*
10 seg	90
15 seg	60
20 seg	45

*Considerar siempre los 4 tubos del 100% de reducción

A los 15 minutos exactos de incubación del primer tubo se para la reacción adicionando 660 μ L de CuCl_2 0.8 mM y 15 segundos después se adiciona al 2° y así sucesivamente, agitando inmediatamente después con el vortex.

Se lee la absorbencia de cada tubo a 560 nm ajustando a cero con la mezcla de reacción, (usar el zipper del espectrofotómetro para obtener las lecturas más rápido).

Una vez realizado lo anteriormente descrito se mide la concentración de proteínas totales contenidas en el ensayo por el método de Lowry de la manera descrita en el apéndice 5 y se realizan los cálculos como se describe en material y métodos.

7.1 Actividad de la superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD)

Los reactivos utilizados además de los reactivos usados para SOD total, son los siguientes:

Reactivos	Catálogo	PM	Almacenamiento
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Mallinckrodt 7088	228.23	T ambiente
KH_2PO_4	JTBaker 3246-01	136.09 g	T ambiente
EDTANa_2	JTBaker 8993	372.3	T ambiente
Dietilditiocarbamato	Sigma D-9428	225.3	Congelación (-20°C)
Bolsas de diálisis	Sigma D-9777		T ambiente

Nota: las bolsas de diálisis son de membrana de celulosa.

Soluciones

Amortiguador de diálisis (fosfatos 5 mM, pH 7.8 – 0.1 mM EDTA)

	g/1 litro	g/2 litros	g/4 litros
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.233	0.4666	0.9332
KH_2PO_4	0.5416	1.0832	2.1664
EDTA	0.0372	0.0744	0.1488

Se ajusta el pH con NaOH, generalmente con 5 perlas son suficientes para ajustar y se almacena a temperatura ambiente.

DDC 100 mM (preparar en el momento).

Gramos de DDC	ml de agua	Número muestras	de
0.0225	1.0	6	
0.0450	2.0	13	
0.0675	3.0	20	
0.0900	4.0	26	
0.1125	5.0	33	

Procedimiento:

Diálisis de las muestras.

Se cortan trozos de 4.5 cm. del tubo de diálisis y se remojan en agua con agitación durante 24 horas. Se cortan trozos de hilo para amarrar las bolsas de diálisis, y se cierra un extremo haciendo un nudo. Posteriormente se colocan 200 μ l de la muestra tratado con DDC, durante 1 hora a 30°C (se colocan en tubos de vidrio de 12 x 75 mm 150 μ l de muestra del homogenado + 150 μ l de DDC 100 mM dentro de la bolsa, se cierra perfectamente el otro extremo de la bolsa y se coloca en un recipiente que contiene amortiguador de diálisis, sujetando la punta del hilo de cada bolsa con una cinta adhesiva a la pared externa del recipiente y etiquetándolo para identificar cada bolsa. La diálisis se realiza con agitación constante.

POR CADA 200 μ l DE MUESTRA SE REQUIERE DE 80 ml DE AMORTIGUADOR DE DIÁLISIS (400 VOLÚMENES) Y DE 2 CAMBIOS, por lo tanto, serán 3 horas de diálisis.

Al final se saca el dializado usando una micropipeta de 200 μ l y se coloca en tubos eppendorf de 1.5 ml debidamente etiquetados.

Para determinar la actividad de la Mn-SOD se sigue el procedimiento ya descrito para la determinación de SOD total, solo que en este caso se hace una dilución a las muestras dializadas 1:50 con amortiguador de fosfatos 50Mm pH 7, pero la dilución final a considerar para calcular la actividad en este ensayo es 1:100 ya que previamente se había diluido 1:2 con DDC.

Una vez realizado lo anteriormente descrito, se mide por el método de Lowry, la concentración de proteínas totales contenidas en la muestra del dializado que se colocó en el ensayo de la manera descrita en el apéndice 5. Los cálculos se realizan como se describe en material y métodos.

APÉNDICE 8.

Actividad de CAT

Los reactivos utilizados son:

Reactivos	Catálogo	Almacenamiento	PM
KH ₂ PO ₄	JT Baker 3246-01	Temp. ambiente	136.09 g/mol
Na ₂ HPO ₄	JT Baker 3828-05	Temp. ambiente	141.96 g/mol
Peróxido de hidrógeno	Mallinckrodt 5240	Refrigeración	34.01 g/mol

Soluciones:

Amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0

	250 ml	500 ml	1000 ml
KH ₂ PO ₄	0.2105 g	0.421 g	0.842 g
Na ₂ HPO ₄	0.135 g	0.270 g	0.540 g

Ajustar el pH con NaOH

Peróxido de hidrógeno 30 mM (se prepara en el momento de la reacción)

La solución al 30% tiene 300g/L, $M = 300 \text{ g}/34.01 = 8.82$. Por lo tanto, la solución al 30% es 8.82 M.

Entonces $V_1C_1 = V_2C_2$ en donde $V_1 = x$, $C_1 = 8.82$, $V_2 = 50 \text{ ml}$, $C_2 = 0.03 \text{ M}$

Lo que significa que $V_1 = 0.17 \text{ ml}$

Por lo tanto se agregan 170 μl de peróxido de hidrógeno al 30% a 50 ml de amortiguador de fosfatos 10 mM.

Procedimiento:

Se enciende el espectrofotómetro y la lámpara ultravioleta 15 minutos antes de empezar el ensayo con el objeto de calentar la lámpara.

Se usa el programa de cinética (lecturas cada 15 seg durante 30 seg. en el espectrofotómetro Beckman DU 64).

Se calibra a cero con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0

Se diluye la muestra del homogenado 1:30 (5 ml de muestra + 145 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM).

Se colocan en un tubo de vidrio de 12 x 75, 25 μl de la dilución y 725 μl de H_2O_2 30 mM.

Se agita con vortex inmediatamente y se vacía el contenido del tubo por decantación a una celda de cuarzo de 1 cm. de poro. Todo esto se realiza lo más rápido posible para iniciar la lectura rápidamente.

Se lee a una absorbencia de 240 nm.

Los resultados se expresan en k/mg de proteína, por lo tanto es necesario medir la concentración de proteínas totales en la muestra por el método de Lowry (técnica descrita en el apéndice 5) y se realizan los cálculos como se describe en material y métodos.

Soluciones:

Amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0

	250 ml	500 ml	1000 ml
KH_2PO_4	0.2105 g	0.421 g	0.842 g
Na_2HPO_4	0.135 g	0.270 g	0.540 g

Ajustar el pH con NaOH

Peróxido de hidrógeno 30 mM (se prepara en el momento de la reacción)

La solución al 30% tiene 300g/L, $M = 300 \text{ g}/34.01 = 8.82$. Por lo tanto, la solución al 30% es 8.82 M.

Entonces $V_1C_1 = V_2C_2$ en donde $V_1 = x$, $C_1 = 8.82$, $V_2 = 50 \text{ ml}$, $C_2 = 0.03 \text{ M}$

Lo que significa que $V_1 = 0.17 \text{ ml}$

Por lo tanto se agregan 170 μl de peróxido de hidrógeno al 30% a 50 ml de amortiguador de fosfatos 10 mM.

Procedimiento:

Se enciende el espectrofotómetro y la lámpara ultravioleta 15 minutos antes de empezar el ensayo con el objeto de calentar la lámpara.

Se usa el programa de cinética (lecturas cada 15 seg durante 30 seg. en el espectrofotómetro Beckman DU 64).

Se calibra a cero con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0

Se diluye la muestra del homogenado 1:30 (5 ml de muestra + 145 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM).

Se colocan en un tubo de vidrio de 12 x 75, 25 μl de la dilución y 725 μl de H_2O_2 30 mM.

Se agita con vortex inmediatamente y se vacía el contenido del tubo por decantación a una celda de cuarzo de 1 cm. de poro. Todo esto se realiza lo más rápido posible para iniciar la lectura rápidamente.

Se lee a una absorbencia de 240 nm.

Los resultados se expresan en k/mg de proteína, por lo tanto es necesario medir la concentración de proteínas totales en la muestra por el método de Lowry (técnica descrita en el apéndice 5) y se realizan los cálculos como se describe en material y métodos.

X BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Lichtman A, Pober J. 1999. Inmunología celular y molecular. 3ª edición. Ed. Interamericana. McGraw Hill. España pp. 4-7.
- Adhirai M, Selvam R. 1998. Effect of cyclosporin on liver antioxidants and the protective role of vitamin E in hyperoxaluria in rats. *J Pharm Pharmacol* 50:501-505.
- Aebi HE. 1984. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Ahmed SS, Napoli KL, Strobel HW. 1995. Oxygen radical formation during cytochrome P-450-catalyzed cyclosporine metabolism in rat and human liver microsomes at varying hydrogen ion concentrations. *Mol Cell Biochem* 151:131-140.
- al Khader A, al Sulaiman M, Kishore PN, et al. 1996. Quinacrine attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Transplantation* 62:427-435.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, et al. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *Am Soc Nutr Sci* 955S-962S.
- Avissar NS, Omt DB, Yagil Y, Horowitz S, et al. 1994. Human Kidney proximal tubule are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 266:C367-365.
- Bannister JV, Rotilio G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22:111-180
- Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91:2-13.
- Block E. The chemistry of garlic and onions. 1985. *Sci Am* 252:114-119.
- Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, et al. 1994. Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 46:773-779.
- Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, et al. 1998. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthase gene expression. *Am J Physiol* 274:F791-F798.
- Brenner BM, Rector JT. 2000. The kidney. 6ª edición. WB. Saunders Company, USA, vol.I, pp.5, 1201-1202.
- Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, et al. 1994. Phospholipic-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 269:7342-7248.
- Burk RF. Molecular biology of selenium with implication for its metabolism. 1991. *FASEB J* 5:2274-2279.
- Campistol JM, Sacks SH. Mechanisms of nephrotoxicity. 2000. *Transplantation* 69:SS5-SS10
- Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. 1993. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 268:2571-2575.

- Clarke H, Ryan MP. 1999. Cyclosporine A-induced alterations in magnesium homeostasis in the rat. *Life Sci* 64:1295-1306.
- Cristol JP, Vela C, Maggi MF, et al. 1998. Oxidative stress and lipid abnormalities in renal transplant recipients with or without chronic rejection. *Transplantation* 10:1322-1328.
- Damrau F. 1991. The use of garlic concentrate in vascular hipertensión. *Med Record* 153:249-25.
- Dunn CJ, Wagstaff AJ, Pery CM, et al. 2001. Cyclosporine: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral®) in organ transplantation. *Drugs* 61:1957-2016.
- Ferguson CJ, Ruhland C, Parry-Jones DJ, et al. 1993. Low-dose cyclosporin nephrotoxicity in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 8:1259-1263.
- García GJ, Sánchez MFJ. 2000. Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Arch Lat Nutr* 50:219-229.
- Gend Z, Lau BHS. 1997. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 11:54-46.
- Guyton AC, Hall J. 1997. Tratado de fisiología médica. 9ª edición. Interamericana McGraw-Hill. México, pp.345-347, 361-364, 369-371.
- Goodman RT, Gilman BJ. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. McGraw-Hill. México, vol.II, pp.1371-1373,1378.
- Harris ED. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEBJ* 6:2675-2683.
- Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. 1991. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol* 278-286.
- Horie T, Murayama T, Mishimi T, et al. 1989. Protection of liver microsomal membranes from lipid liperoxidation by garlic extract. *Planta Med* 5:506-508.
- Hsu JL, Visner GA, Burr IA, et al. 1992. Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: isolation, characterization and species comparison. *Biochem Biophys Res Commun* 186:936-943.
- Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 10:340-341.
- Inselmann G, Lawørenz HU, Nellesen U, et al. 1994. Enhancement of cyclosporin A-induced hepato- and nephrotoxicity by glutathione depletion. *Eur J Clin Invest* 24:355-359.
- Inselmann G, Blank M, Baumann K, et al. 1998. Cyclosporine-A induced lipid peroxidation in microsomes and effect on active and passive glucose transport by brush border membrane vesicles of rat kidney. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 62:207-220.
- Imai J, Ide N, Nagae S, et al. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 60:417-420.
- Iqbal J, Whitney P. 1991. Use of cyanide and diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 10:69-77.

- Jassen YMW, Houten V B, Borm PJA, *et al.* 1993. Biology of disease Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 69:261-274.
- Jung D, Biggs H, Erickson J, *et al.* 1975. New colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 21:1138-1140
- Kahan BD. 1989. Cyclosporine. *N Engl J Med* 25:1725-1738.
- Kanji VK, Wang C, Salahudeen AK. 1999. Vitamin E suppresses cyclosporine A-induced increase in the urinary excretion of arachidonic acid metabolites including F2-isoprostanes in the rat model. *Transplant Proc* 31:1724-1728.
- Krisky NI, Deneke SM. 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoid. *J Nat Cancer* 69:205-209
- Krisky NI. 1992. Mechanism of action of biological antioxidant. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:248-254
- Kroll MH, Roach NA, Poe B, *et al.* 1987. Mechanism of interference with the Jaffe reaction for creatinine. *Clin Chem* 33:1129-1132.
- Krystopik RJ, Bentley FR, Spain DA, *et al.* 1997. Lazaroids prevent acute cyclosporine-induced renal vasoconstriction. *Transplantation* 63:1215-1220.
- Kumano K, Yoshida M, Iwamura T, *et al.* 1989. The role for reactive oxygen species in cyclosporin A induced nephrotoxicity in Rats. *Transplant Proc* 21:941-942
- Lewin G, Popov I. 1994. Antioxidant effects of aqueous garlic extract. *Drug Res* 44:604-607.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055.
- Maldonado PD. Nefrototoxicidad por gentamicina. 2000. Efecto protector del ajo y su relación con superóxido dismutasa. Tesis Facultad de Química, UNAM pp3-4.
- Marimuthu A, Ramasamy S. 1998. Effect of cyclosporin on liver antioxidants and the protective role of vitamin E in hiperoxaluria in rats. *J Pharm Pharmacol* 50:501-505.
- Marklund SL. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7634-7638.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.
- Mathieson PW. 2000. Cyclosporin: nephro-protective as well as nephrotoxic. *Clin Exp Immunol* 121:179-180.
- Matsuda S, Koyasu S. 2000. Mechanism of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47:119-125.
- Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, *et al.* 1986. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clin Nephrol* 25:S2-S8.
- Mowry BJA, McCarthy. 1996. Cyclosporine in glomerular disease, *Nephron* 16:548-554.

- Salazar Y. 2000. *ALLIUM SATIVUM L.* Un agente antitrombótico diferente. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc* 1:155-160.
- Salin ML, Day DE, Crapo JD. 1978. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from rat liver. *Arch Biochem Biophys* 187:223-228
- Serino F, Grevel J, Napoli KL, et al. 1993. Generation of oxygen free radicals during the metabolism of cyclosporine A: a cause-effect relationship with metabolism inhibition. *Mol Cell Biochem* 122:101-112.
- Singh I, Gulati S, Orak JK, et al. 1993. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 125:97-104.
- Stadtman ER. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanisms and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9:315-321.
- Sunde RA. 1990. Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 10:451-474.
- Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, et al. 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306:284-287.
- Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto Y, et al. 1990. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem* 108:145-148.
- Tariq M, Morais C, Sobki S, et al. 1999. N-acetylcysteine attenuates cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 14:923-929.
- Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, et al. 1990. Evidence that alterations in renal metabolism and lipid peroxidation may contribute to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 50:487-492.
- Wang C, Salahudeen AK. 1995. Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney Int* 47:927-934.
- Wei Z, Lau BHS. 1998. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 18:61-70.
- Weinberg DS, Manier ML, Richardson MD. 1993. Identification and quantification of organosulfur mediated markers in garlic extract. *J Agric Food Chem* 41:37-41.
- Weisger RA, Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248:4793-4796.
- Wolf A, Clemann N, Friauff W, et al. 1994a. Role of reactive oxygen formation in the cyclosporin A-mediated impairment of renal functions. *Transplant Proc* 26:2902-2907.
- Wolf A, Trendelenburg CF, Friauff W, et al. 1994b. Role of glutathione in cyclosporin A *in vitro* hepatotoxicity. *Transplant Proc* 26:2912-2914.
- Yoshimura S, Suemizu H, Taniguchi Y, et al. 1994. The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32. *Gene* 145:293-297.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.

Zentella M, Saldaña BY. 1995. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol Educ Bioq* 15:152-161.

Zima T, Tesar V, Stipek S, *et al.* 1998. The influence of cyclosporin on lipid peroxidation and superoxide dismutase in adriamycin nephropathy in rats. *Nephron* 75:464-468.

Zhong Z, Connor HD, Yin M, *et al.* 2001. Viral delivery of superoxide dismutase gene reduces cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 59:1397-1404.

Zhong Z, Connor HD, Yin M, *et al.* 1999. Dietary glycine and renal denervation prevents ciclosporin A-induced hydroxyl radical production in rat kidney. *Mol Pharmacol* 56:455-463.