

00524
67



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

EL DIALIL DISULFURO ATENUA EL DAÑO RENAL Y EL
ESTRES OXIDATIVO INDUCIDOS POR GENTAMICINA
EN RATAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ANA ELENA GONZALEZ OROZCO



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

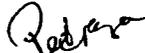
Presidente	Prof. Homero Hernández Montes.
Vocal	Prof. Francisco Hernández Luis.
Secretario	Prof. José Pedraza Chaverri.
1er suplente	Prof. Raquel Ortega Muñoz.
2do. Suplente	Prof. Javier Alfredo Carballo Perea.

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio de Bioquímica Clínica 209, Departamento de Biología, Edificio B.
Facultad de Química, UNAM, México D.F.**

**Este trabajo de investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y
Tecnología (Proyecto No. 34920 M).**

Asesor:	Dr. José Pedraza Chaverri
Sustentante:	Ana Elena González Orozco



Dr. José Pedraza Chaverri

AGRADECIMIENTOS

Primero que nadie quiero agradecerle a Dios por iluminarme siempre en mi camino y por estar siempre a mi lado para poder salir adelante en cualquier circunstancia.

A mis papás, porque finalmente son los que están siempre junto a mí apoyándome cualquiera que sea la decisión que yo tome, muchas gracias por el amor, el apoyo, la confianza y la comprensión que siempre me han brindado.

A mis hermanos, Toño y Lalo, porque no importa lo que se les interponga siempre están luchando por obtener lo que quieren, gracias por darme ese ejemplo de coraje y tenacidad.

A una persona muy especial para mí, mi gran amigo Adolfo, gracias por estar siempre en las buenas y en las malas a mi lado y pase lo que pase siempre te voy a considerar mi mejor amigo.

A mis amigas, Marcela, Karla, Ingrid, Ana, mis amigos Pedro, Carlos, Jonathan y Juan por tener siempre una palabra de aliento y de apoyo para conmigo y por permitirme brindarles mi amistad durante todos estos años.

A mis primas, Alma y Liliana, gracias por todos los momentos que hemos compartido juntas, siempre las voy a considerar como mis hermanas.

A mi familia en general, mi abuelita, mis tíos, tías, primas, primos, todos, muchas gracias por el ejemplo de unión y apoyo que me han brindado.

A todos mis compañeros del laboratorio 209, Perla, Jessica (las dos), Diana, Omar, Yolanda, Rosaura, Lety, Carlos, Miguel, la Dra. Ma. Elena Ibarra, la Dra. Martha Menjivar y Paty, muchísimas gracias por enseñarme y por ayudarme en todo lo necesario para sacar este trabajo adelante.

Muy en especial, gracias al Dr. José Pedraza por confiar en mí, por darme la oportunidad de trabajar con él y por brindarme su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASB	Albumina sérica bovina
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
cGPx	Glutación peroxidasa citosólica
CT	Grupo control
Cu,Zn-SOD	Superóxido dismutasa de cobre, zinc
DADS	Dialil disulfuro
DAS	Dialil sulfuro
DATS	Dialil trisulfuro
DDC	Ditiocarbamato de dietilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTU	Dimetiltiourea
DNPB	Dinitrofenilhidrazina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
giGPx	Glutación peroxidasa gastrointestinal
GM	Gentamicina
GM+DADS	Grupo tratado con gentamicina y dialil disulfuro
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSH-Rx	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación transferasa
HCl	Ácido clorhídrico
H&E	Hematoxilina y eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IRA	Insuficiencia renal aguda
Mn-SOD	Superóxido dismutasa de manganeso
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
NBT	Nitroazul de tetrazolio
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
pGPx	Glutación peroxidasa en suero
piGPx	Glutación peroxidasa de fosfolípidos
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-EC	Superóxido dismutasa extracelular
TCA	Ácido tricloroacético

RESUMEN

La gentamicina es un antibiótico de amplio espectro que pertenece a la familia de los aminoglucósidos y se utiliza en la clínica principalmente para el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias gram negativas. Sin embargo, el uso de dicho medicamento se ha limitado debido a que uno de los efectos colaterales que presenta con más frecuencia es la nefrotoxicidad. Se ha estimado que aproximadamente un 20% de los pacientes cuyo tratamiento con GM excede más de una semana, presentan insuficiencia renal aguda. Se sabe, desde tiempos muy antiguos, que el ajo presenta actividad antioxidante. En estudios recientes se ha demostrado que una dieta enriquecida con polvo de ajo al 2% previene el daño renal inducido por GM; por lo tanto, en este trabajo se pretende investigar si el DADS (dialil disulfuro), un metabolito derivado del ajo con propiedades antioxidantes, es uno de los compuestos que pueda contribuir a explicar el efecto protector del polvo de ajo. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de un peso aproximado 250-260 g (9-10 semanas de edad). La nefrotoxicidad se indujo vía subcutánea mediante la aplicación de Garamicina a una dosis de 70 mg/kg de peso cada 12 horas durante 4 días. Se evaluaron cuatro grupos: i) Control (CT), ii) Gentamicina (GM), iii) Dialil disulfuro (DADS) y iv) GM+DADS. Los parámetros utilizados como marcadores para evaluar el daño tubular fueron: proteinuria, excreción urinaria de *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), los cuales aumentaron en el grupo administrado con GM y actividad de glutatión peroxidasa en suero (pGPx), la cual disminuyó en el grupo GM. Los marcadores utilizados para evaluar el daño glomerular fueron: concentración de creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN), ambos aumentaron en el grupo administrado con GM. Se extrajeron los dos riñones de cada animal para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa citosólica (cGPx), glutatión reductasa (GSH-Rx), superóxido dismutasa así como sus diferentes isoformas Mn-SOD y Cu,Zn-SOD; la actividad de la enzima CAT disminuyó en los grupos GM, DADS y GM+DADS y la actividad de la isoforma Cu,Zn-SOD no se modificó en ninguno de los grupos tratados; con respecto a las otras enzimas (glutatión peroxidasa citosólica (cGPx), glutatión reductasa

(GSH-Rx), y Mn-SOD) su actividad disminuyó en el grupo tratado con GM; de igual manera se cuantificó el contenido de carbonilos en las proteínas oxidadas de corteza renal observándose un incremento en el contenido de los mismos al administrar GM. Además en corteza renal también se realizaron estudios histológicos para evaluar el daño estructural observándose vacuolización y necrosis en las células epiteliales del túbulo proximal del grupo administrado con GM. El tratamiento de DADS con GM evitó de manera parcial el aumento tanto de la excreción urinaria de NAG y de proteínas y previno de manera parcial la disminución en la actividad de la enzima pGPx; de igual manera, el aumento en los parámetros glomerulares se previno de manera significativa en el tratamiento con GM+DADS. Los cortes de ratas administradas con GM y DADS mostraron una marcada mejoría con respecto al grupo GM. Así mismo se previno el aumento del contenido de grupos carbonilo en las proteínas oxidadas al administrar GM+DADS. La administración de DADS a las ratas tratadas con GM no previno la disminución en la actividad de CAT pero sí previno de manera total la de las enzimas cGPx, GSH-Rx, SOD total y Mn-SOD. Estos datos sugieren que el DADS es capaz de disminuir el daño renal ocasionado por la administración de GM, lo cual se debe probablemente, a su capacidad de prevenir la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes así como a su capacidad de prevenir el estrés oxidativo gracias a sus propiedades antioxidantes. El DADS puede ser una de las moléculas derivadas del ajo que contribuya a explicar el efecto protector del polvo de ajo en la nefrotoxicidad ocasionada por GM.

F

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Gentamicina (GM)	1
1.1.1. Estructura química de la GM	1
1.1.2. Mecanismo de acción de la GM	2
1.1.3. Farmacocinética de la GM	2
1.1.4. Toxicidad de la GM	2
1.2. Nefrototoxicidad provocada por GM	2
1.2.1. Participación de las EROs en la nefrototoxicidad por GM	3
1.3. Especies reactivas de oxígeno (EROs)	4
1.3.1. Anión superóxido	5
1.3.2. Peróxido de hidrógeno	6
1.3.3. Radical hidroxilo	6
1.4. Mecanismos antioxidantes de defensa contra las EROs	7
1.4.1. Antioxidantes enzimáticos	7
1.4.1.1. Superóxido dismutasa	7
1.4.1.2. Catalasa	7
1.4.1.3. Glutación peroxidasa	8
1.4.1.4. Glutación reductasa	9
1.5. Generalidades del riñón	9
1.5.1. Insuficiencia renal aguda	11
1.6. El ajo: componentes y propiedades	12
1.6.1. Evidencias que sustentan las propiedades del DADS	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	17
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1. Reactivos	18
5.2. Animales	18
5.3. Tratamiento de los animales	18
5.4. Obtención de las muestras	19
5.5. Determinaciones	20
5.5.1. Actividad de <i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminidasa en orina	20
5.5.2. Excreción de proteínas totales en orina	21
5.5.3. Glutación peroxidasa (cGPx y pGPx)	21
5.5.4. Histología	22
5.5.5. Creatinina en suero	23
5.5.6. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	24
5.5.7. Proteínas oxidadas	24
5.5.8. Catalasa	26

5.5.9. Glutatión reductasa	26
5.5.10. Superóxido dismutasa (SOD total, Mn-SOD y Cu,Zn SOD)	26
5.6. Análisis estadístico	27
6. RESULTADOS	28
6.1. Peso corporal	28
6.2. Volumen urinario	28
6.3. Parámetros de daño tubular	29
6.3.1. Actividad de la NAG en orina	29
6.3.2. Excreción de proteínas totales en orina	29
6.3.3. Actividad de GPx en suero	30
6.4. Histología	30
6.5. Parámetros de daño glomerular	32
6.5.1. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	32
6.5.2. Creatinina en suero	32
6.5.3. Depuración de creatinina	33
6.6. Proteínas oxidadas	33
6.7. Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal	34
6.7.1. Actividad de CAT	34
6.7.2. Actividad de GPx en corteza renal	34
6.7.3. Actividad de GSH-Rx	35
6.7.4. Actividad de SOD total	35
6.7.5. Actividad de Mn-SOD	36
6.7.6. Actividad de Cu,Zn-SOD	36
7. DISCUSIÓN	37
8. CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Gentamicina (GM)

La GM es un antibiótico de amplio espectro, importante para tratar muchas infecciones graves provocadas por microorganismos gram negativos, principalmente enterobacterias como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, y *Serratia marcescens* (1). La GM pertenece a la familia de los aminoglucósidos; es el aminoglucósido de primera elección por su bajo costo y su actividad fiable contra casi todos los aerobios gram negativos. Sin embargo, uno de los efectos secundarios que presenta este antibiótico es la nefrotoxicidad. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los pacientes tratados con aminoglucósidos por más de 7 días presentan insuficiencia renal aguda (2).

1.1.1. Estructura química de la GM

La GM está constituida por dos aminoazúcares (purpurosamina y garosamina) unidos por enlaces glucosídicos a un núcleo central (2-desoxiestreptamina). Las variaciones en la metilación de la purpurosamina genera a los diferentes componentes en la subfamilia de la GM, que incluye a las gentamicinas C1, C1a, C2 (3) (Fig. 1). La GM es una sustancia hidrosoluble, de carácter básico debido a la presencia de sus grupos amino.

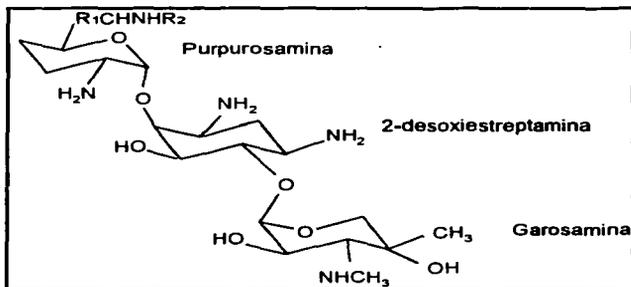


Fig. 1. Estructura química de la GM. Componentes que integran la subfamilia: C1: R1=R2=CH₃; C1a: R1=R2=H; C2: R1= CH₃; R2=H.

1.1.2. Mecanismo de acción

Su acción bactericida es producida por la alteración en la síntesis de proteínas. La GM después de penetrar a la membrana citoplásmica se liga a los ribosomas causando una lectura errónea y terminación prematura de la traducción del ARNm. Las proteínas aberrantes producidas pueden ser insertadas en la membrana bacteriana, con lo cual se altera su permeabilidad y se estimula el paso de más aminoglucósido. La membrana al perder su integridad selectiva ocasiona la pérdida de iones pequeños, moléculas grandes y finalmente proteínas esenciales de la bacteria provocando su muerte (3).

1.1.3. Farmacocinética

Los aminoglucósidos son cationes fuertemente polares y de este modo, su absorción en las vías gastrointestinales es muy pequeña. Menos del 1% se absorbe después de la ingestión o de la aplicación rectal. La GM se absorbe con rapidez de los sitios de inyección intramuscular, las concentraciones máximas en plasma se alcanzan después de 30 a 90 minutos; su vida media en plasma es corta: 1 a 4 horas en humanos y de 30 minutos en animales pequeños de laboratorio (4). La GM se une muy poco a las proteínas plasmáticas, no se metaboliza en el cuerpo y se excreta casi por completo mediante filtración glomerular, alcanzando concentraciones de 50 a 200 $\mu\text{g/mL}$ en la orina (1,3) y es reabsorbida particularmente en células del túbulo proximal.

-1.1.4. Toxicidad de la GM

Dentro de los efectos colaterales más graves generados por la GM se encuentran la ototoxicidad y la nefrotoxicidad.

1.2. Nefrotoxicidad provocada por GM

Las dosis terapéuticas de GM y otros aminoglucósidos pueden provocar nefrotoxicidad en humanos y el uso prolongado de esta clase de antibióticos se conoce como una de las principales causas de insuficiencia renal aguda (IRA) (2,5). De hecho, la función renal en los pacientes es monitoreada durante la terapia con el tratamiento con GM y a pesar de que el daño es generalmente reversible una vez que se suspende el tratamiento, se complican las condiciones del paciente prolongando su estancia en el hospital incrementando los gastos médicos.

El daño renal inducido por GM está caracterizado por un aumento en la excreción urinaria de la enzima lisosomal *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa (6,7), incremento del nitrógeno de urea en sangre (BUN) (7), aumento de la creatinina sérica (7,8) y la disminución en la depuración de creatinina (8) subsecuente a una disminución en la filtración glomerular. También se ha observado que la nefrotoxicidad por GM está caracterizada por necrosis tubular localizada principalmente en los túbulos proximales. La absorción neta de la GM por el riñón, da como resultado una alta concentración del fármaco en la corteza renal; la vida media del fármaco en tejido renal es de aproximadamente 100 horas (9). El mecanismo por el cual la GM es incorporada a los túbulos proximales es mediante la interacción del aminoglucósido con carga positiva con los fosfolípidos aniónicos en el borde del cepillo de las células tubulares, posteriormente el fármaco se internaliza mediante un proceso de pinocitosis (10,11) y se acumula en los lisosomas de las células de los túbulos proximales; donde inactiva enzimas como fosfolipasas (A y C) y esfingomielinasas, causando acumulación de fosfolípidos e interfiriendo con la función normal de los lisosomas (12).

El mecanismo exacto por el cual se induce la nefrotoxicidad por GM es incierto aún; sin embargo, hay evidencias de que las especies reactivas de oxígeno (EROs) están implicadas en dicho daño.

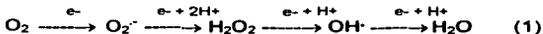
1.2.1. Participación de las EROs en la nefrotoxicidad por GM.

Las especies reactivas de oxígeno producen daño celular y necrosis vía varios mecanismos dentro de los cuales se encuentra la peroxidación de lípidos en la membrana de las células, desnaturalización de proteínas y daño a nivel del ADN (13). Muchos han sido los estudios llevados a cabo para evaluar el proceso mediante el cual se induce la nefrotoxicidad por GM y dentro de estos se ha encontrado que las EROs juegan un papel importante en la inducción de dicho daño renal. Las evidencias *in vitro* demuestran que la GM incrementa la generación de peróxido de hidrógeno por la mitocondria de corteza renal de rata (14) con la probable formación de otras EROs, radical hidroxilo y anión superóxido (15), las cuales pueden alterar procesos intracelulares. En este mismo sentido, se ha observado que la GM induce la liberación de hierro de mitocondrias en la corteza renal de ratas mediado por la

generación de peróxido de hidrógeno (14,16); el hierro liberado forma un complejo con la GM que induce la formación de EROs las cuales pueden conducir a la peroxidación de lípidos en corteza renal (17). Con respecto a esto, se ha encontrado que atrapadores de radicales hidroxilo como el dimetilsulfóxido (DMSO), dimetiltiourea (DMTU), quelantes de hierro como la deferoxamina, tienen efecto protector en el daño renal inducido por GM ya que este último es importante en la generación de radicales hidroxilo (15). Así mismo, experimentos *in vivo*, han demostrado que la enzima SOD y el glutatión reducido (GSH), sistemas antioxidantes importantes en el organismo, disminuyen en las ratas al ser administradas con GM lo cual contribuye a que se presente el daño renal; sin embargo, al administrar SOD en ratas tratadas con este antibiótico se observó que ésta protege notoriamente contra el daño en la función renal (7,18).

1.3. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva. Dentro de estas especies reactivas las que son de mayor interés para la biología o la clínica son aquellas derivadas del oxígeno (19). El oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aeróbicos; sin embargo, a altas concentraciones puede llegar a ser tóxico debido a la producción de especies reactivas que se generan. La formación de estas especies reactivas de oxígeno se lleva a cabo a partir de la reducción incompleta del oxígeno en los sistemas biológicos, siendo principalmente tres especies las que se forman: el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). El oxígeno generalmente acepta cuatro electrones y es convertido directamente a agua en la cadena respiratoria mitocondrial mediante el complejo citocromo oxidasa (20), la reacción se lleva a cabo secuencialmente:

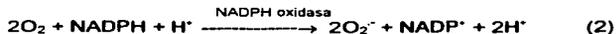


Se calcula que del oxígeno respirado del 1 al 3% es usado para formar anión superóxido (O_2^-) tanto en la cadena de transporte de electrones dentro de la

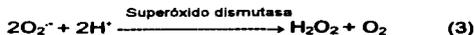
mitocondria como en el retículo endoplásmico. Estas reacciones son inevitables en un organismo dependiente del oxígeno. Además este radical, también es producido por los fagocitos como parte del mecanismo empleado para erradicar organismos extraños como bacterias (21). El peróxido de hidrógeno no es un radical libre debido a que no posee electrones desapareados; sin embargo, es un agente que puede difundirse hasta llegar a zonas donde hay pocas defensas antioxidantes. El radical hidroxilo es uno de los agentes más reactivos ya que interactúa prácticamente con la estructura molecular más cercana y la célula no tiene mecanismos antioxidantes enzimáticos que puedan combatirlo; por lo tanto, las células tienen que prevenir su formación mediante la eliminación de los precursores, anión superóxido y peróxido de hidrógeno, por medio de sus defensas enzimáticas. Cuando por alguna razón aumenta en exceso la producción de radicales libres en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser ineficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidativo, en la cual existe daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a la muerte celular.

1.3.1. Anión superóxido (O_2^-)

El anión superóxido es la primera especie reactiva de oxígeno formada durante la reducción univalente del oxígeno. Se forma cuando el oxígeno gana un electrón. Bajo condiciones normales es producido en bajas concentraciones por el metabolismo celular a partir de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en reacciones de la enzima xantina oxidasa durante el catabolismo de las bases púricas, mediante la autooxidación de varias moléculas dentro de las cuales se encuentran las catecolaminas, la ubisemiquinona en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y la hemoglobina. El anión superóxido también se origina durante la descarga respiratoria de los procesos fagocíticos de las células de defensa inmunológica, a través de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa (22).



El anión superóxido sufre una dismutación *in vivo* solamente con la ayuda de la enzima superóxido dismutasa (SOD):



1.3.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno es formado en los organismos durante las reacciones de oxidación de quinonas, oxidación de compuestos que contienen grupos sulfhidrilos y mediante la dismutación del anión superóxido por la acción de la enzima superóxido dismutasa (Reacción 3). Sin embargo, la fuente más importante de formación del H_2O_2 en las células es en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Este compuesto no es un radical libre ya que tiene todos sus electrones apareados. Es un oxidante poco reactivo; sin embargo, puede reaccionar con iones como el hierro y el cobre mediante la reacción de Fenton dando lugar a la formación del radical hidroxilo (23).

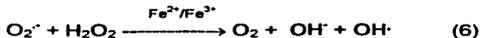


1.3.3. Radical hidroxilo (OH^\cdot)

In vivo, el radical hidroxilo se produce mediante la reacción de Fenton (reacción 4). Por otro lado, el anión superóxido aumenta la producción de Fe^{2+} , lo cual incrementa la reacción de Fenton mediante la reacción:



El conjunto de las reacciones descritas; es decir, la dismutación del anión superóxido (O_2^-) que lleva a la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual a su vez se descompone en radical hidroxilo (OH^\cdot) con intervención del Fe^{2+} , constituye el ciclo de Haber-Weiss:



El radical hidroxilo es una molécula muy reactiva y su producción es crítica ya que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en el organismo (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos) (23). Las células al no tener mecanismos antioxidantes que puedan combatirlo; usan como estrategia para prevenir su formación, la eliminación de sus precursores los cuales son O_2^- y H_2O_2 mediante sus defensas antioxidantes.

1.4. Mecanismos antioxidantes de defensa contra las EROs

Los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa contra las EROs que tienden a impedir su formación o a reaccionar con ellas para convertirlas en especies menos reactivas. Estos sistemas de defensa se clasifican en dos tipos: antioxidantes enzimáticos dentro de los cuales se tienen a las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GSH-Rx) y glutatión peroxidasa (GPx) y los antioxidantes no enzimáticos naturales como son el glutatión, la vitamina C, β -carotenos, compuestos organosulfurados del ajo, etc.

1.4.1. Antioxidantes enzimáticos

1.4.1.1. Superóxido dismutasa (SOD) (óxido reductasa EC 1.15.1.1)

Es una metaloenzima que lleva a cabo la reacción de dismutación del anión superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno (reacción 3). La SOD es pH independiente y tiene una alta afinidad por su sustrato, es resistente al calor o a compuestos desnaturalizantes como la urea. En los mamíferos, la SOD posee tres isoformas; Mn-SOD, Cu-Zn-SOD y SOD-EC, las tres se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos y son productos de genes diferentes. Dos de estas isoformas poseen en su sitio activo Cu y Zn; una de ellas se localiza en el citosol y la otra es extracelular; la tercera isoforma tiene en su sitio activo Mn y ésta se localiza en la matriz mitocondrial (24). La SOD no es propiamente una enzima detoxificante, ya que el producto de su actividad es el H_2O_2 el cual también causa daño celular; sin embargo, este es solo el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación de las EROs. El siguiente paso depende de la enzima catalasa.

1.4.1.2. Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.6)

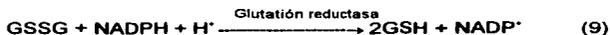
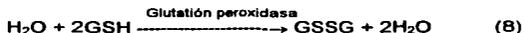
La catalasa es una hemoproteína tetramérica con peso molecular de 240 kDa, con cuatro ferritoporfirinas por molécula; su vida media en circulación es relativamente corta de 6 a 8 minutos. Se localiza principalmente en los peroxisomas (80%) y en la mitocondria. En tejidos de mamíferos, la CAT está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (25). Además de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la peroxidasa de leucocitos compiten por el H_2O_2 como sustrato, razón por la cual no hay un aparente efecto

dañino con la deficiencia de la enzima. La reacción que lleva a cabo esta enzima es la siguiente:



1.4.1.3. Glutatión peroxidasa (GPx) (glutatión: H₂O₂ oxidoreductasa EC 1.11.1.9)

Esta enzima cataliza la descomposición de H₂O₂ o de otros peróxidos orgánicos mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) (reacción 8). El GSSG es a su vez reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa (GSH-Rx) en presencia de NADPH (reacción 9) formando un ciclo redox impidiendo que se agoten las reservas de GSH (26).

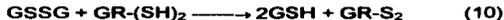


Se conocen diferentes isoformas de ésta enzima, la cual contiene un átomo de selenio en su sitio activo:

- GPx citosólica (cGPx): es una enzima tetramérica de 84 kDa que solo tiene actividad antioxidante en casos de incremento de H₂O₂ y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra una baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol.
- GPx en suero (pGPx): es un tetrámero de 100 kDa, se sintetiza principalmente en el riñón; se cree que tiene un papel protector en el riñón durante el daño oxidativo. Actualmente se considera un marcador del daño al túbulo proximal, su actividad plasmática disminuye durante la necrosis tubular aguda. En la circulación se encuentra como un homotetrámero (27).
- GPx gastrointestinal (giGPx): es un tetrámero de 75 kDa; se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal de los roedores y en el humano se ha encontrado en hígado y colon. Se piensa que tiene un efecto protector contra los efectos adversos de los hidroperóxidos.
- GPx de fosfolípidos (piGPx): es una hidroperoxidasa de fosfolípidos, está unida a membranas intracelulares y tiene una menor afinidad por GSH que las demás.

1.4.1.4. Glutatión reductasa (GSH-Rx) (EC 1.6.4.2)

Es una enzima que requiere NADPH y que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) por medio de las siguientes reacciones:



En donde GR(SH)₂ y GR-S₂ corresponden a las formas reducidas (ditiol) y oxidadas (disulfuro) de la glutatión reductasa, respectivamente (28). Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de glutatión reducido, el cual sirve como antioxidante al reaccionar con radicales libres y peróxidos orgánicos, participa en el transporte de aminoácidos y es sustrato de glutatión peroxidasa y de glutatión S transferasa durante la detoxificación de peróxidos orgánicos y en el metabolismo de xenobióticos.

1.5. Generalidades del riñón

El riñón realiza dos funciones fundamentales: en primer lugar; eliminar gran parte de los productos metabólicos terminales del organismo y en segundo lugar, controlar las concentraciones de la mayor parte de los componentes de los líquidos corporales. En el humano, las dimensiones del riñón son aproximadamente 12x6x3 cm; se localizan por debajo del diafragma en la cavidad abdominal posterior. El peso de cada riñón varía de 125-170 g en el hombre y de 115-155 g en la mujer. Están divididos en dos grandes secciones: la corteza y la médula (Fig. 2).

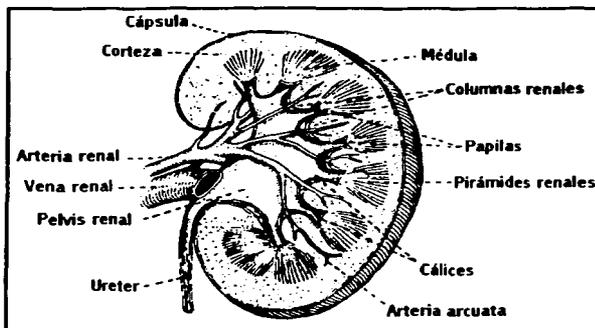


Fig. 2. Estructura interna del riñón.

La nefrona es la unidad funcional del riñón, está constituida básicamente por i) un glomérulo a través del cual se filtra la sangre y ii) un túbulo largo, en el que el líquido filtrado es convertido en orina en su camino hacia la pelvis renal. El glomérulo se localiza en la corteza renal, es una red de hasta 50 capilares paralelos cubiertos por células epiteliales que están incluidas en la cápsula de Bowman, la presión de la sangre en el glomérulo hace que se filtre el líquido hacia la cápsula de Bowman, de ahí, pasa al túbulo proximal situado también en la corteza renal. Desde el túbulo proximal, el líquido pasa al asa de Henle, localizada en la médula del riñón, posteriormente entra al túbulo distal, el cual al igual que el túbulo proximal, se encuentra en la corteza renal, y finalmente pasa al túbulo colector que se encarga de reunir el líquido de varias nefronas para luego vaciarse en la pelvis renal (Fig. 3). Cuando el filtrado pasa a través de los túbulos, estos permiten que gran parte del agua y cantidades variables de soluto se reabsorban en los mismos; el agua y solutos que no se reabsorben se transforman en orina (29).

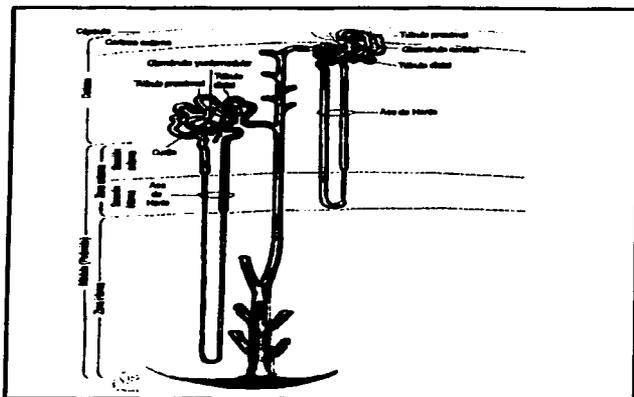


Fig. 3. Estructura de la nefrona.

1.5.1. Insuficiencia renal aguda (IRA)

Es una enfermedad que se caracteriza por una disminución abrupta de la filtración glomerular, resultando en la acumulación de productos finales del metabolismo en el organismo como la urea y la creatinina. La insuficiencia renal aguda (IRA) puede dividirse en tres grupos dependiendo de las causas que la provoquen:

- a) Insuficiencia renal aguda secundaria a la disminución de la irrigación sanguínea del riñón; este cuadro se conoce como insuficiencia renal aguda prerenal, ya que la alteración se produce antes del riñón.
- b) Insuficiencia renal aguda intrarenal, la cual es secundaria a alteraciones del interior del riñón.
- c) Insuficiencia renal aguda postrenal, secundaria a una obstrucción del sistema colector de la orina en algún lugar entre los cálices y el tracto de la salida de la vejiga (30).

1.6. El ajo: componentes y propiedades

El ajo conocido botánicamente como *Allium sativum*, es una planta ampliamente distribuida y es utilizada en todo el mundo, no solo como un condimento en las comidas, sino también como remedio en la medicina popular. Este vegetal se sigue utilizando gracias a la gran cantidad de estudios que se han realizado en los que se demuestra que el ajo posee propiedades antimicrobianas, antitrombóticas, hipoglucemiantes, antihipertensivas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, entre otras (31-34).

Uno de los rasgos más característicos del ajo es su alto contenido de compuestos organosulfurados. Cerca del 95% del azufre en los dientes de ajo intactos se encuentra en dos clases de compuestos: sulfóxidos de S-alquicisteína y γ -glutamyl-S-alquicisteínas. El compuesto de azufre más abundante en el ajo es la alina. El olor característico del ajo no está presente como tal en la planta intacta sino que se desprende al momento de triturar o cortar los dientes de ajo. Dentro del bulbo del ajo, la alina (sulfóxido de cisteína, inodoro), es almacenada en las células mesofílicas que no contienen a la enzima alinasa; ésta se encuentra compartimentalizada dentro de la célula y cuando el ajo es sometido a un proceso mecánico como el trituarlo o cortarlo, la enzima se libera y entra en contacto con la alina formando alicina (tiosulfinato) (35), la cual es responsable principalmente del olor característico del ajo fresco recién cortado pero no del aceite de ajo. La alicina y otros tiosulfatos se descomponen en otros compuestos azufrados como el ajoene, ditinas, dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS) y dialil trisulfuro (DATS) (36,37). El DADS es uno de los metabolitos que se ha detectado en el aliento de los humanos después de consumir ajo (38-41); no se encuentra como tal en los dientes de ajo; más bien es un producto de la transformación de la alicina. Lo anterior demuestra que este compuesto es un metabolito que se produce *in vivo*.

De manera comercial se pueden obtener los derivados de tiosulfatos dependiendo del tratamiento que se les aplique (medio y temperatura). En presencia de agua, DATS, DADS y alil metil trisulfuro son los productos principales. Mediante destilación por arrastre de vapor en los dientes de ajo triturados, se obtiene el aceite comercial en el cual se encuentran muchos compuestos azufrados siendo los de

mayor proporción: dialil (57%), alil metil y dimetil sulfuro (37%) y el resto otros compuestos organosulfurados. Mediante la incubación a temperatura ambiente y con disolventes orgánicos como hexano o éter, se obtienen dos compuestos adicionales: vinilditinas en mayor proporción y ajoene (Fig. 4). Los principales componentes del aceite de ajo que se obtiene por destilación, son DADS (39%), DATS (35%) y DAS (10%) (42); compuestos organosulfurados que han comenzado a ser estudiados para determinar su actividad. De hecho, la gran mayoría de las investigaciones farmacológicas realizadas con respecto al ajo se han centrado en estudiar a sus compuestos azufrados debido a que no solamente se encuentran en mayor proporción en el mismo sino que son los únicos compuestos del ajo que se sabe tienen actividad farmacológica a dosis que representan niveles normales de consumo de ajo (36). En este sentido, se ha observado que los extractos de ajo envejecido, cuyos principales componentes son la S-alil-cisteína y S-alil-mercaptocisteína, inhiben la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico inducidas por el t-butil hidroperóxido en fracciones microsomales de hígado *in vivo* (43). Los compuestos organosulfurados del extracto envejecido de ajo son eficaces para atrapar H₂O₂ e inhibir lipoperoxidación en un modelo *in vitro* (44). Los compuestos alilo que están presentes en el aceite de ajo presentan actividad microbiana *in vitro* y la magnitud de su actividad está relacionada con el número de átomos presentes en estos compuestos (45). Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que el polvo de ajo es capaz de proteger contra el daño renal inducido por la administración de GM en ratas (46); de igual manera se observó que la administración de DAS protege de manera parcial contra este daño (47). También con respecto al aceite de ajo, se ha observado que tiene un efecto modulador en las enzimas encargadas de metabolizar fármacos y su efecto puede ser atribuido a sus tres principales componentes sulfurados (DADS, DATS, DAS); de igual manera se ha demostrado que inhiben la carcinogénesis inducida por benzo[a]pireno en modelos animales y juegan un papel importante en la modulación del sistema antioxidante relacionado con GSH en el hígado y eritrocitos de las ratas (42,48,49). Por estas razones; recientemente, el DADS, compuesto derivado del ajo, se ha estudiado para determinar la actividad que posee como antioxidante y anticancerígeno.

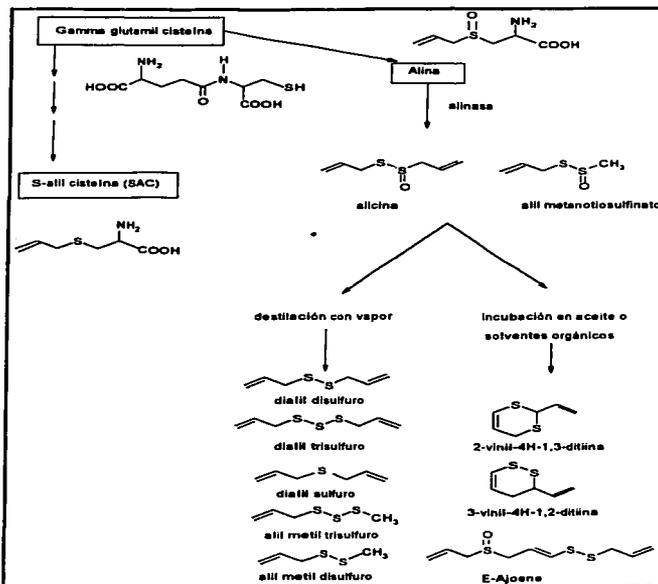


Fig. 4. Acción de la alinasa sobre la alina para dar alicina, la cual a su vez da origen a diversos compuestos organosulfurados.

1.6.1. Evidencias que sustentan las propiedades del DADS.

La alina da lugar a la formación de compuestos organosulfurados cuando el ajo sufre un proceso mecánico o cuando es metabolizado en el organismo; uno de estos compuestos es el DADS. Este compuesto corresponde a un 39% del aceite esencial de ajo (42). Al igual que el ajo, se ha reportado que el DADS posee actividades anticancerígenas y antioxidantes, entre otras. Entre estas se encuentra que: la administración de DADS, retarda significativamente el crecimiento de tumores

mamarios inducidos por *N*-metil-*N*-nitrosourea en ratas; de igual manera, fue muy efectivo en inhibir el crecimiento *in vitro* de líneas celulares de tumores humanos (colon, pulmón y piel) (50,51). Se ha observado también que el DADS puede disminuir los niveles de colesterol en plasma y en hígado (52). El DADS es capaz de inhibir la peroxidación de lípidos en hígado inducida por tetracloruro de carbono así como de atrapar a los radicales libres formados por el mismo y prevenir la oxidación inducida por tetracloruro de carbono en albúmina; de igual manera es capaz de interaccionar con los radicales libres inducidos por Fe *in vitro* utilizando un sistema de liposomas (53,54). También se ha observado que está presente en el aliento de los humanos después de consumir ajo (38-41), lo cual demuestra que es un metabolito que se genera *in vivo*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La gentamicina (GM) es el antibiótico de primera elección que se utiliza para tratar padecimientos ocasionados por bacterias gram negativas (1). Sin embargo, su utilidad clínica se ve disminuida debido a que uno de los efectos secundarios que presenta es la nefrotoxicidad. De hecho, se ha encontrado que aproximadamente el 20% de los pacientes tratados con aminoglucósidos por más de 7 días presentan insuficiencia renal aguda (2).

Existen evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de que las especies reactivas de oxígeno (EROs) juegan un papel muy importante en la nefrotoxicidad ocasionada por gentamicina (GM).

Se sabe que el ajo, entre otras, posee actividad antioxidante y ésta se le atribuye a sus compuestos organosulfurados. Recientemente en nuestro laboratorio se observó que una dieta enriquecida con polvo de ajo al 2% disminuye la nefrotoxicidad ocasionada por GM (46), este efecto protector se asoció a una prevención de estrés oxidativo renal; sin embargo, aún no se identifica al compuesto o compuestos responsable(s). Es por eso, que el dialil disulfuro (DADS), uno de los metabolitos con propiedades antioxidantes, que se obtiene al consumir ajo, se escogió para determinar si es responsable de la protección contra la nefrotoxicidad inducida por GM.

3. HIPÓTESIS

Dado que en una dieta enriquecida con polvo de ajo al 2% se observó que el daño renal inducido por GM disminuyó, la administración de dialil disulfuro, en ratas tratadas con gentamicina evitará el daño renal producido por este antibiótico.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto protector del dialil disulfuro, metabolito del ajo, en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina, evaluando el daño renal mediante marcadores tubulares, glomerulares y de daño estructural así como el estrés oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar si la administración de DADS presenta un efecto protector sobre el daño renal ocasionado por GM evaluando:

- Marcadores de daño tubular: actividad de *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en orina, proteinuria y actividad de glutatión peroxidasa en suero (pGPx).
- Marcadores de daño glomerular: nitrógeno de urea en sangre (BUN) y creatinina en suero.
- Daño estructural de los túbulos mediante una tinción de hematoxilina y eosina (H&E).
- Estrés oxidativo mediante la presencia de proteínas oxidadas en corteza renal
- Actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

5. METODOLOGÍA

5.1. Reactivos

El p-nitrofenil- β -D-glucosaminido, el p-nitrofenol, la albúmina sérica bovina (ASB), la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), la glutatión reductasa (GSH-Rx), el glutatión reducido (GSH), el glutatión oxidado (GSSG) la leupeptina, la pepstatina A, la aprotinina, la dinitrofenilhidrazina (DNPH), el sulfato de estreptomycin, la guanidina-HCl, la xantina oxidasa, la xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el ditiocarbamato de dietilo (DDC), el reactivo de Folin & Ciocalteu's phenol, el amortiguador HEPES y las bolsas de diálisis fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El citrato trisódico y la azida de sodio fueron de Merck (Alemania). El carbonato de sodio, el ácido tricloroacético (TCA), el EDTA disódico, las sales de fosfatos para los amortiguadores, el sulfato de cobre, el cloruro de sodio, el cloruro de cobre (II), el sulfato de amonio y el hidróxido de sodio fueron de J.T. Baker (México, D.F.). El peróxido de hidrógeno al 30% y el tartrato de sodio fueron de Mallinckrodt (México, D.F.). La gentamicina (GM) que se utilizó fue la presentación comercial Garamicina® solución inyectable de 160 mg/2 mL de Schering-Plough. (México, D.F.). Las determinaciones de urea en sangre y creatinina se realizaron con estuches comerciales de la marca Spinreact, S.A. (España). El dialildisulfuro fue de LKT laboratories, Inc. (St. Paul, MN).

5.2. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-260 g de peso (9-10 semanas de edad), las cuales fueron mantenidas durante todo el tratamiento en jaulas metabólicas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h (6:00 a.m. – 18:00 p.m.) con alimentación y agua *ad libitum*.

5.3. Tratamiento de los animales

Se utilizó un total de 36 ratas las cuales se dividieron en los siguientes grupos: i) grupo control (CT) (n=9); al cual se le administró solución salina tanto por vía subcutánea cada 12 horas como por vía intragástrica cada 24 horas; ii) grupo gentamicina (GM) (n=9); al cual se le administró GM a una dosis de 70 mg/kg de

peso cada 12 horas; iii) grupo dialil disulfuro (DADS) (n=9); al cual se le administró DADS a una dosis de 50 mg/kg de peso vía intragástrica cada 24 horas y; iv) GM+DADS (n=9) al cual se le administró DADS a una dosis de 50 mg/kg de peso cada 24 horas vía intragástrica, 30 minutos después se le administró GM por vía subcutánea a una dosis de 70 mg/kg de peso y aproximadamente 12 horas más tarde se le administró GM nuevamente. Para estos ensayos DADS se preparó en aceite de maíz como vehículo y se les administró a los animales en un volumen entre 12 y 15 μ l por dosis.

5.4 Obtención de las muestras

El tratamiento se aplicó durante 4 días consecutivos, se suspendió el día 5 y los animales se sacrificaron por decapitación este último día. El peso corporal se monitoreó a diario y se midió el volumen urinario de 24 h de los días 0, 2 y 4. La orina se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga IEC HN-SII. Aliquotas de cada muestra (1.5 mL) fueron colocadas en tubos eppendorf y se congelaron a -45° C para su uso posterior. Al momento del sacrificio, la sangre de las ratas se colectó de manera individual en tubos de vidrio, después de un tiempo se separó el coágulo, se centrifugaron las muestras a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y aliquotas del suero fueron colocadas en tubos eppendorf, congelándolas a -45° C hasta su uso.

Por otra parte, los riñones de cada una de las ratas fueron disecados, uno de los cuales se cortó en tres partes; la parte más delgada se fijó en 500 μ L de formol al 10% para preparar posteriormente cortes histológicos. Las partes sobrantes y el otro riñón se guardaron en tubos eppendorf y se congelaron a -45° C para posteriormente preparar los homogeneizados. Antes de preparar el homogeneizado, la corteza renal fue separada de la médula, los cortes fueron homogeneizados en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7, tritón 10%, empleando un homogeneizador tipo politrón Brinkmann durante 10 seg. Los homogeneizados fueron centrifugados en una microcentrífuga Beckmann a 15,300 rpm durante 1 hora a 4° C determinando en ellos el contenido de carbonilos en las proteínas oxidadas y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, cGPx y GSH-Rx.

5.5. Determinaciones

- En las orinas de los días 0, 2 y 4 se determinó la excreción de la enzima *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), así como la excreción de proteínas. La concentración de creatinina se determinó solamente en las orinas del día 4.
- En el suero se midió la concentración de nitrógeno de urea, de creatinina, y la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.
- En la corteza renal se determinó la concentración de carbonilos en las proteínas oxidadas y la actividad de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx renal), GSH reductasa (GSH-Rx) y las diferentes isoformas de la superóxido dismutasa (SOD, Mn-SOD y Cu-Zn SOD).
- Se realizaron cortes histológicos del riñón para evaluar el daño estructural.

En todas las determinaciones se utilizó un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640 y sus diferentes programas: longitud de onda fija (Fixed wavelength), protein y kinetics.

5.5.1. Actividad de *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en orina (EC 3.2.1.30)

La actividad de la enzima NAG se determinó a través de un ensayo basado en la conversión del *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -D-glucosaminido en *p*-nitrofenol, que a pH ácido es incoloro y se encuentra protonado y al alcalinizar el medio pasa de su forma protonada a su forma aniónica la cual absorbe a 405 nm (Fig. 5).

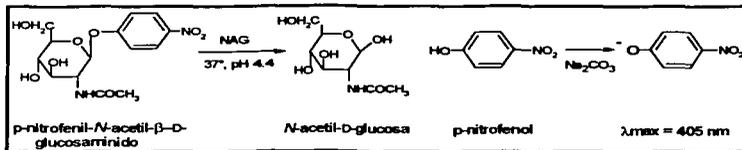


Fig. 5. Fundamento para la detección de la *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa.

Se utilizaron 50 μ l de orina sin diluir, se agregaron a 375 μ l de un amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.4 y posteriormente se les adicionaron 125 μ l de sustrato (*p*-nitrofenil β -D-glucosaminido) a una concentración final de 6.8 mM (55,56). Para

cada muestra se preparó un blanco sin sustrato con 500 µl de amortiguador de citratos; y para evaluar la conversión espontánea del sustrato se preparó un blanco con amortiguador de citratos 550 µl sin muestra de orina y un tubo con 425 µl de amortiguador de citratos y 125 µl de sustrato. Todos los tubos se agitaron y se incubaron a 37 °C durante 15 min. La reacción se detuvo con 1.1 mL de Na₂CO₃ 0.2 M, pH 10.4 y las muestras se leyeron a 405 nm. Las absorbencias de la forma aniónica del p-nitrofenol se interpolaron en una curva de calibración de p-nitrofenol en un intervalo de 5 a 175 nmol. Los resultados se expresaron como unidades (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un micromol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo.

5.5.2. Excreción de proteínas totales en orina

La concentración de proteínas totales eliminadas en la orina se determinó por medio de su precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y la medición de la turbidez a 420 nm (57). Para ello; después de centrifugar las orinas, se diluyeron 1:5 con solución salina (volumen final 2 mL), posteriormente las muestras se separaron en dos alícuotas de 1000 µL; a una se le agregaron 250 µL de TCA al 12.5% y a la otra 250 µL de solución salina ya que ésta última se utilizó como blanco. Todos los tubos se dejaron incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la determinación de la concentración, los resultados de absorbencias se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) entre 0.04 y 0.8 mg/mL. Los resultados se expresaron en mg de proteína/24 h.

5.5.3. Glutatión peroxidasa (cGPx y pGPx) (EC. 1.11.1.19)

La actividad de esta enzima se midió tanto en las muestras de suero como en los homogeneizados de la corteza renal de manera indirecta, mediante un par de reacciones en las que en presencia de la enzima, el glutatión reducido (GSH) y H₂O₂ se genera glutatión oxidado (GSSG). El GSSG es reducido a su vez por la glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor (Fig. 6).

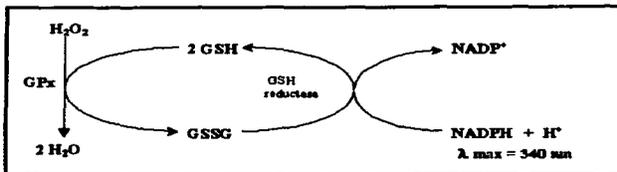


Fig. 6. Actividad de la GPx y regeneración del glutatión oxidado por medio de la GSH-Rx.

La reacción se basa en la disminución de la absorbencia del NADPH (340 nm) (58). Las muestras de suero se diluyeron 1:8 previamente con un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 (volumen final 240 μ L). En un tubo se mezclaron 100 μ L de la muestra diluida y 800 μ L de la mezcla de reacción mantenida en hielo, la cual contenía EDTA disódico, azida de sodio, NADPH, glutatión reductasa, glutatión reducido y amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se adicionó a una celda de cuarzo que contenía 100 μ L de una solución preparada con 2 μ L de H_2O_2 al 30% en 10 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. La absorbencia a 340 nm se leyó durante 3 min a intervalos de 1 min. Como control se utilizó un blanco el cual carecía de la muestra experimental. Los resultados se expresaron en U/mL donde una unidad equivale a la oxidación de un micromol de NADPH por minuto.

5.5.4. Histología

Las porciones de riñón fijadas con formol al 10% en amortiguador de fosfatos salino (PBS), se trataron con etanol y xilol y posteriormente se embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 4 μ m y fueron colocados en portaobjetos a los cuales se les eliminó la parafina con xilol; para ser posteriormente rehidratados con diferentes preparaciones de etanol en agua (100%, 96% y 70%) y ser teñidos con hematoxilina-eosina (H&E). Finalmente, los cortes ya teñidos se deshidrataron pasando por soluciones de etanol y xilol; se prepararon para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos. Los cortes se analizaron con un microscopio de luz (Leica Qwin Image Analyzer) observando la morfología de los

túbulos proximales; buscando indicios de vacuolización y necrosis que indican el daño renal.

5.5.5. Creatinina en suero

La creatinina presente en suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé (Fig. 7), basada en la generación de un color anaranjado al reaccionar la creatinina con el ácido picrico en solución alcalina. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra.

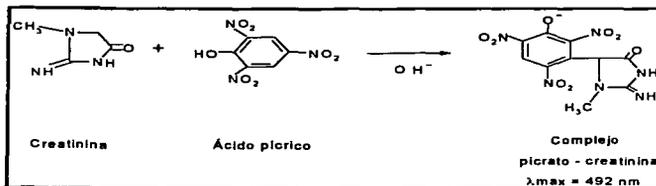


Fig. 7. Reacción de Jaffé.

Para ello, el suero se desproteinizó previamente por precipitación con TCA al 1.25%, posteriormente las muestras se centrifugaron 10 minutos a 5,000 rpm en una microcentrífuga Beckmann. En una celda se adicionaron 50 μL del suero desproteinizado y 500 μL de la mezcla de reacción (ácido picrico 17.5 mM e hidróxido de sodio 0.29 M, 1:1), se leyó en el espectro a los 0, 30, 60 y 90 seg. Se leyó primeramente un blanco que carecía de las muestras experimentales, posteriormente se leyó el estándar de creatinina de 2 mg/dL a los tiempos antes mencionados. La cantidad de creatinina presente en las muestras se obtuvo comparando la diferencia de lecturas entre los tiempos de 30 y 90 segundos con aquella del estándar de creatinina, posteriormente se dividió la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y finalmente se multiplicó el resultado por la concentración del estándar. Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dL.

5.5.6. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

La concentración de la urea en el suero se determinó con un método colorimétrico adaptado de la reacción propuesta por Jung *et al.*, 1975 (59) (Fig. 8). Se basa en la reacción de la urea con el ortoftalaldehído a 37° C en medio ácido desarrollando un producto colorido que muestra un máximo de absorberencia a 510 nm.

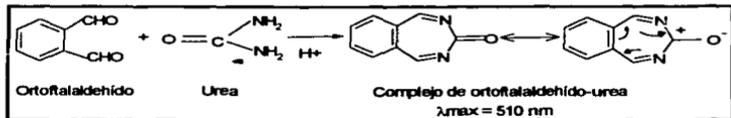


Fig. 8. Reacción entre la urea y el ortoftalaldehído.

Se mezclaron 10 μL de la muestra con 400 μL de ortoftalaldehído (4.8 mM) y 400 μL de borato (87 mM), los tubos se incubaron a 37° C por 15 min; transcurrido ese tiempo se leyeron las absorbencias. En las mismas condiciones se incluyó un blanco que carecía de la muestra experimental y un estándar de urea de 50 mg/dL. La concentración de urea en el suero se obtuvo dividiendo la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y el resultado se multiplicó por la concentración del estándar de urea. Finalmente la cantidad de nitrógeno de la urea se obtuvo dividiendo la concentración entre 2.14 factor que nos indica el número de átomos de nitrógeno en una molécula de urea. Los resultados se expresan en mg/dL.

5.5.7. Proteínas oxidadas

La 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) reacciona con los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas presentes en las muestras para formar un complejo proteína-hidrazona (60) el cual absorbe a 370 nm (Fig. 9).

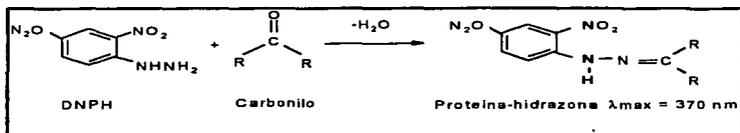


Fig. 9. Reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina y los grupos carbonilo.

El contenido de carbonilos en las proteínas oxidadas se determinó en los homogeneizados de corteza de riñón preparados en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7 en presencia de inhibidores de proteasas: leupeptina (5 $\mu\text{g/mL}$), pepstatina A (7 $\mu\text{g/mL}$) y aprotinina (5 $\mu\text{g/mL}$), EDTA 1 mM y tritón X-100 al 0.1%. Los homogeneizados se incubaron con 100 μL de sulfato de estreptomycin al 10% durante una noche. Al día siguiente se centrifugaron 150 μL de los sobrenadantes y se colocaron en 2 tubos eppendorf; a uno de los tubos se le agregaron 600 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM disuelta en HCl 2.5 M y el otro tubo se preparó para determinar el contenido de proteínas totales en el homogeneizado agregándole 600 μL de HCl 2.5 M. Una vez adicionados la DNPH y el HCl, las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad agitándolas cada 15 minutos. A continuación las muestras fueron precipitadas con TCA al 20 y 10% con la finalidad de precipitar las proteínas y lavar, centrifugando posteriormente durante 10 minutos a 4,500 rpm y 4°C; los lípidos y la DNPH libre se extrajeron con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1). Los precipitados se resuspendieron en guanidina-HCl 6 M y finalmente se leyeron a 370 nm.

El contenido de carbonilos que expresa la cantidad de proteínas oxidadas se determinó utilizando el coeficiente de extinción del DNPH (22,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y el dato de la concentración total de proteínas determinada a 280 nm en los tubos sin DNPH. Los resultados se expresan como nmoles de carbonilos/mg de proteína.

5.5.8. Catalasa (EC.1.11.1.6)

La actividad de la enzima se midió por medio de una reacción cinética en donde disminuye la absorbencia del H_2O_2 debido a su degradación por la catalasa de acuerdo al método de Aebi (61). El sobrenadante de los homogeneizados diluidos en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 se mezcló en proporción 1:30 con H_2O_2 7.7 mM y se leyó a los 15 y 30 segundos a 240 nm. La actividad de catalasa se determinó usando la constante de reacción de primer orden k como la unidad de actividad de la catalasa, la cual se define de acuerdo a la siguiente fórmula:

$k = (1/\Delta t) (2.3 \times \log [A_1]/[A_2])$ donde $t =$ intervalo de tiempo medido, $[A_1]$ y $[A_2]$ son las absorbencias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Finalmente, la actividad específica se calculó al dividir el valor de k entre los mg de proteína adicionados al ensayo determinado por el método de Lowry *et al.* (62). La actividad se expresó como k/mg de proteína.

5.5.9. Glutati3n reductasa (EC 1.6.4.2)

La actividad de esta enzima se determinó en homogeneizado de corteza renal por medio de una reacción cinética en la cual la enzima convierte el glutati3n oxidado (GSSG) a glutati3n reducido (GSH) en presencia de NADPH como cofactor. La reacción se basa en la disminuci3n de la absorbencia del NADPH que absorbe a 340 nm (63). En un tubo se mezclaron 50 μL del homogeneizado previamente diluido 1:5 en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6, con 950 μL de la mezcla de reacci3n la cual contenía EDTA 0.5 mM, glutati3n oxidado (GSSG) 1.25 mM y NADPH 0.1 mM. La mezcla se adicionó a una celda de cuarzo y se procedió con la lectura a la longitud de onda antes mencionada; la absorbencia se leyó durante 3 min a intervalos de 1 min utilizando como blanco amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6. Los resultados se expresaron en U/mg proteína en donde 1U=1 μmol de NADPH oxidado/min.

5.5.10. Super3xido dismutasa (SOD total, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD) (EC 1.15.1.1)

Se midió en los homogeneizados de corteza renal por medio de una reacci3n en la cual se inhibe la reducci3n del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones

superóxido generados por el sistema xantina-xantina oxidasa. La reacción se leyó a 560 nm; longitud de onda a la cual absorbe el NBT reducido. Para llevar a cabo la determinación de SOD total, se colocaron 165 μL de sobrenadante del homogeneizado de riñón previamente diluidos 1:100 en dos tubos; se incubaron durante 15 minutos con 815 μL de una mezcla de reacción que contenía xantina 0.3 mM, EDTA 0.6 mM, NBT 150 mM, Na_2CO_3 400 mM y albúmina 0.1%; las reacciones se iniciaron agregando 17 μL de xantina oxidasa (168 U/L) a uno de los tubos a intervalos de 10 segundos entre cada muestra; el otro tubo se utilizó como blanco agregando 17 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 en lugar de xantina oxidasa. Las reacciones se detuvieron a intervalos de 10 segundos después de los 15 minutos de incubación con CuCl_2 0.8 mM. Se utilizaron además tubos de 100% de reducción de NBT, los cuales carecían de muestra. Finalmente la cantidad de NBT reducido se leyó a 560 nm y la actividad de SOD total se determinó en base a la concentración de proteína total añadida al ensayo. Para determinar la actividad de la Mn-SOD, se les agregó a las muestras ditiocarbamato de dietilo (DDC) (64) para inactivar la isoforma Cu,Zn-SOD y se incubaron a 30°C durante 1 hora, posteriormente se dializaron las muestras durante 3 horas en agitación con buffer de diálisis y se siguió el mismo procedimiento empleado para la determinación de la actividad de SOD total. La actividad de Cu,Zn-SOD en corteza renal se determinó mediante la diferencia entre la actividad de SOD total y Mn-SOD. Los resultados se expresaron como U de SOD/mg de proteína.

5.6. Análisis estadístico

Los datos se reportaron como la media \pm la desviación estándar. Los datos se analizaron con el programa Prism 3.0 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) usando la prueba de ANOVA y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. PESO CORPORAL

Ni la gentamicina (GM) ni el dialil disulfuro (DADS) tuvieron efecto sobre el peso corporal de las ratas (Fig. 10). No hubo diferencias significativas entre los grupos durante todo el experimento.

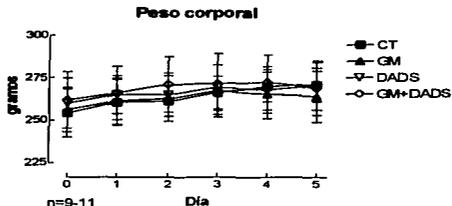


Fig. 10. Efecto de GM y de DADS sobre el peso corporal.

6.2. VOLUMEN URINARIO

Se observó un aumento significativo del volumen urinario del día 4 tanto en el grupo GM (15 ± 5) como en el grupo GM+DADS (18 ± 5) con respecto al control (8 ± 2). El volumen urinario del grupo tratado sólo con DADS (8 ± 3) no presentó diferencias con respecto al control (Fig. 11).

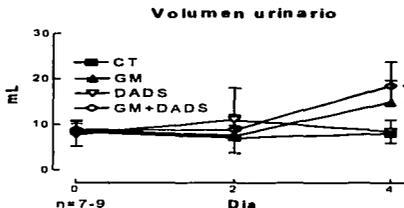


Fig. 11. Efecto de GM y de DADS sobre el volumen urinario. * $p < 0.05$ vs. CT y DADS. ** $p < 0.001$ vs. CT y DADS.

6.3. PARÁMETROS DE DAÑO TUBULAR

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

El grupo de ratas tratadas con GM presentó un aumento significativo de NAG (0.4 ± 0.1) con respecto al control (0.08 ± 0.03). Sin embargo, la administración de DADS a las ratas tratadas con GM (GM+DADS) (0.3 ± 0.02) redujo este incremento de manera parcial pero significativa (Fig. 12).

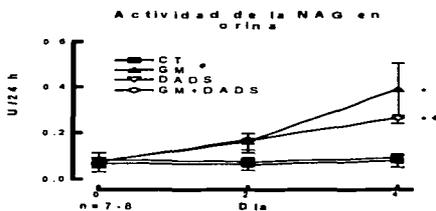


Fig. 12. Efecto de GM y de DADS sobre la actividad de la NAG en orina.
* $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.01$ vs. GM

6.3.2. Excreción de proteínas totales en orina

La proteinuria aumentó de forma significativa en el grupo tratado con GM (63 ± 11) respecto al control (20 ± 4). La administración de DADS a las ratas tratadas con GM (42 ± 12) previno significativamente este aumento (Fig. 13).

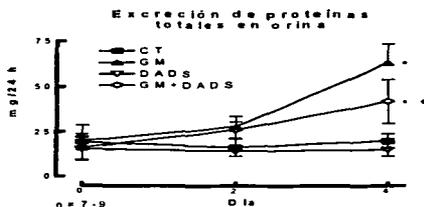


Fig. 13. Efecto de GM y de DADS sobre la excreción de proteínas totales en orina.
* $p < 0.001$ vs. CT y + $p < 0.001$ vs. GM.

6.3.3. Actividad de GPx en suero

La administración de GM (2 ± 0.4) disminuyó de forma significativa la actividad de la GPx en el suero con respecto al control (4 ± 0.5). La administración de DADS en las ratas tratadas con GM previno parcialmente esta disminución pero la diferencia fue significativa (3 ± 0.5) (Fig. 14).



Fig. 14. Efecto de GM y de DADS sobre la actividad de GPx en suero.
* $p < 0.05$ vs. CT; ** $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.01$ y ++ $p < 0.001$ vs. GM.

6.4. Histología

En los cortes histológicos se muestra que las ratas tratadas con gentamicina (GM) presentan daño en los túbulos proximales caracterizado principalmente por necrosis y vacuolización (C); el porcentaje de daño tubular fue de $87.2\pm 11\%$. El tratamiento con DADS a las ratas administradas previamente con GM redujo de manera significativa dicho daño a $52.4\pm 16\%$ (D). Los cortes de las ratas CT y ratas tratadas solamente con DADS no muestran alteraciones renales (A y B) (Fig. 15).

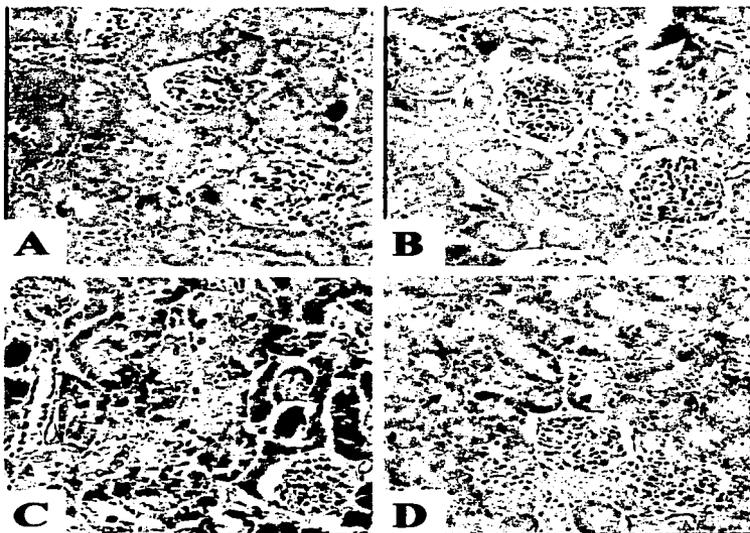


Fig. 15. Microscopia de luz de los cortes de corteza renal de los grupos CT (A), DADS (B), GM (C) y GM+DADS (D). H&E 100X.

6.5. PARÁMETROS DE DAÑO GLOMERULAR

6.5.1. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

Se observó un aumento significativo en el grupo que recibió GM (33 ± 4) con respecto al control (20 ± 3). El DADS previno parcialmente pero significativamente el aumento de BUN inducido por la GM (25 ± 6) (Fig. 16).

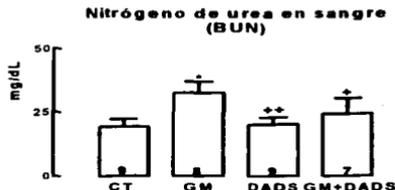


Fig. 16. Efecto de la GM y de DADS sobre el BUN.
* $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.01$ y ++ $p < 0.001$ vs. GM.

6.5.2. Creatinina en suero

La concentración de la creatinina en suero aumentó significativamente en las ratas tratadas con GM (1 ± 0.3) con respecto a la concentración en el suero de las ratas del grupo control (0.7 ± 0.07). De igual manera, la administración de DADS a ratas tratadas con GM previno de forma parcial pero significativa dicho aumento (0.9 ± 0.1) (Fig.17).

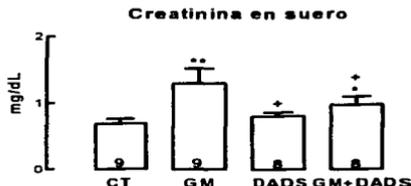


Fig. 17. Efecto de GM y de DADS sobre la creatinina en suero.
* $p < 0.01$ vs. CT.; ** $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.001$ vs. GM.

6.5.3. Depuración de creatinina

La depuración de creatinina disminuyó significativamente en el grupo tratado con GM (0.4 ± 0.08) con respecto al grupo control (0.8 ± 0.2). La administración de DADS a las ratas tratadas con GM previno significativamente dicha disminución (0.8 ± 0.2) (Fig. 18).

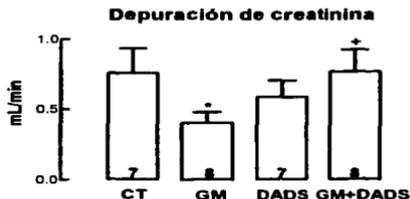


Fig. 18. Efecto de GM y de DADS sobre la depuración de creatinina. * $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.001$ vs. GM.

6.6. PROTEÍNAS OXIDADAS

El tratamiento con la gentamicina (GM) (2.7 ± 0.3) aumentó significativamente el contenido de carbonilos en las proteínas oxidadas en la corteza renal con respecto al control (2.0 ± 0.5). El tratamiento con DADS en ratas tratadas con GM (2.1 ± 0.3) disminuyó su contenido en forma significativa (Fig. 19).

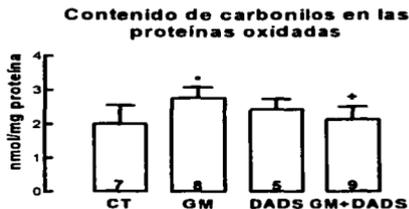


Fig. 19. Efecto de GM y DADS sobre el contenido de carbonilos de las proteínas oxidadas en corteza renal. * $p < 0.01$ vs. CT; + $p < 0.05$ vs. GM.

6.7. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN CORTEZA RENAL

6.7.1. Actividad de catalasa (CAT)

Al igual que en los parámetros que determinan un daño renal, la gentamicina (GM) también disminuyó (0.2 ± 0.05) significativamente la actividad de la CAT cuando se comparó con el grupo control (0.4 ± 0.08). En este caso, el DADS (0.3 ± 0.02) por sí solo disminuyó la actividad de CAT, razón por la cual la administración de DADS a ratas tratadas con GM no restauró la actividad de la enzima (0.2 ± 0.05) (Fig. 20).



Fig. 20. Efecto de GM y de DADS sobre la actividad de la CAT. * $p < 0.01$ y ** $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.001$ vs. GM.

6.7.2. Actividad de glutatión peroxidasa (cGPx) en corteza renal

La actividad de esta enzima disminuyó significativamente en el grupo tratado con GM (0.1 ± 0.02) con respecto al grupo control (0.2 ± 0.03). El DADS administrado a las ratas tratadas con GM previno de manera significativa la disminución de dicha actividad (0.2 ± 0.02) (Fig. 21).



Fig. 21. Efecto de GM y de DADS sobre la actividad de GPx en corteza renal. * $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.001$ vs. GM.

6.7.3. Actividad de glutatión reductasa (GSH-Rx)

Se observó una disminución significativa en la actividad de esta enzima en el grupo tratado con GM (0.04 ± 0.003) con respecto al grupo CT (0.05 ± 0.004). El DADS administrado a las ratas tratadas con GM previno de manera significativa dicha disminución (0.05 ± 0.006) (Fig. 22).



Fig. 22. Efecto de GM y DADS sobre la actividad de la enzima GSH-Rx en corteza renal. * $p < 0.01$ vs. CT; + $p < 0.001$ vs. GM.

6.7.4. Actividad de superóxido dismutasa total (SOD)

La actividad de esta enzima disminuyó significativamente por el tratamiento con GM (15 ± 0.8) con respecto al control (19 ± 1). El tratamiento con DADS administrado previamente a la GM previno dicha disminución de manera total (19 ± 1) (Fig. 23).



Fig. 23. Efecto de GM y DADS sobre la actividad de SOD total en corteza renal. * $p < 0.001$ vs. CT; + $p < 0.001$ vs. GM.

6.7.5. Actividad de superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD)

La actividad de la isoforma Mn-SOD disminuyó significativamente en el grupo tratado con GM (5 ± 0.5) comparándola con el grupo CT (6 ± 0.7). El tratamiento con DADS previno dicha disminución de manera significativa (7 ± 1) (Fig. 24).

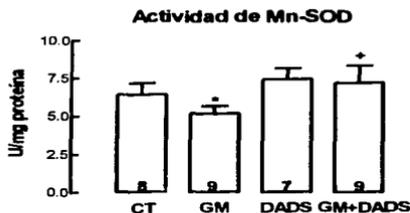


Fig. 24. Efecto de GM y DADS sobre la actividad de Mn-SOD en corteza renal. * $p < 0.05$ vs. CT; + $p < 0.001$ vs. GM.

6.7.6. Actividad de superóxido dismutasa de Cu-Zn (Cu,Zn-SOD)

No se aprecian diferencias significativas en la actividad de Cu-Zn-SOD de los 3 grupos tratados con respecto al control (Fig. 25).



Fig. 25. Efecto de GM y DADS sobre la actividad de Cu,Zn-SOD en corteza renal.

7. DISCUSIÓN

La gentamicina (GM) es un aminoglucósido ampliamente utilizado en la práctica clínica debido a que posee un amplio espectro especialmente contra las bacterias gram negativas, debido a su bajo costo y a que presenta bajos niveles de resistencia dentro de la familia enterobacteriaceae (1). Sin embargo, su uso se ha visto limitado debido a que uno de los efectos colaterales que se presentan con mayor frecuencia es la nefrotoxicidad. Se ha estimado que aproximadamente 20% de los pacientes tratados con este antibiótico por más de 7 días padecen insuficiencia renal (2). El daño renal inducido por GM se hizo evidente con las determinaciones llevadas a cabo ya que se observaron alteraciones tanto a nivel tubular como a nivel glomerular. La administración de GM, como se ha observado en estudios previos (7,8), provocó una disminución en la filtración glomerular que se manifestó en un aumento tanto de la creatinina sérica como del nitrógeno de urea en sangre (BUN) y daño en los túbulos proximales caracterizado por un incremento en la excreción de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), excreción de proteínas totales en orina y disminución en la actividad de la glutatión peróxidasa en suero (pGPx), enzima que se sintetiza en las células del túbulo proximal. Se ha sugerido que el primer paso para inducir el daño renal por GM es por su acumulación en los lisosomas de las células de los túbulos proximales alterando su función y provocando la liberación de enzimas hidrolíticas como la NAG (6,7,12). Por otro lado, se ha observado que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en el daño renal inducido por GM. Existen evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* en donde se observa que especies reactivas de oxígeno (EROs) como O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot , están involucradas en el desarrollo de la insuficiencia renal ocasionada por GM. Se ha sugerido que la GM incrementa la generación de H_2O_2 por la mitocondria en corteza renal así como la liberación de hierro en las mismas lo que induce la formación de un complejo que ocasiona la formación de otras EROs, las cuales a su vez, conducen a la peroxidación de lípidos en corteza renal (14-17). Se sabe que el H_2O_2 producido por la administración de GM así como el O_2^- inducen la contracción de células mesangiales lo que ocasiona que se alteren factores que regulan la velocidad de filtración glomerular (65). De igual manera, se ha demostrado que atrapadores de

especies reactivas de oxígeno, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil tiourea (DMTU), entre otros, tienen efecto protector en el daño renal inducido por GM (15).

En nuestro laboratorio, se observó que una dieta enriquecida con polvo de ajo al 2% induce una protección contra la insuficiencia renal ocasionada por GM y previene el incremento de la lipoperoxidación renal (24,46). Con respecto a esto, se propuso identificar cuál de los compuestos presentes en el polvo de ajo es el responsable de la actividad antioxidante que presenta. Dentro de estos compuestos se encuentran el dialil disulfuro (DADS), dialil trisulfuro (DATS) y dialil sulfuro (DAS). De igual manera, recientemente en nuestro laboratorio, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se observó que el DAS disminuye de forma parcial la nefrotoxicidad ocasionada por GM (47) y el DATS no previene contra dicho daño (30). Debido a esto y a los estudios en los que se ha demostrado que el DADS tiene propiedades antioxidantes (53,54,66), se estudió el posible efecto protector del DADS contra el daño renal ocasionado por GM, además de que ha sido uno de los metabolitos que se ha encontrado en el aliento de los humanos después de consumir ajo lo cual demuestra que se obtiene *in vivo* a partir de la transformación de la alicina (38-41).

En este trabajo se encontró que el DADS previene contra la nefrotoxicidad inducida por GM, esto se asemeja a los resultados obtenidos al administrar una dieta enriquecida con polvo de ajo (46). El tratamiento con DADS a ratas administradas previamente con GM, previno de manera parcial el incremento en los niveles de BUN y de creatinina, la prevención en la disminución de depuración de creatinina (marcadores de daño glomerular), así como el aumento en la excreción de NAG, proteínas en orina y la disminución de GPx en suero (marcadores de daño tubular); probablemente a su capacidad de preservar la actividad de las enzimas antioxidantes encargadas de eliminar los radicales libres y a su capacidad de mejorar la necrosis tubular. Sin embargo, no fue capaz de proteger contra la poliuria inducida por GM. Esto probablemente se deba a que al haber ciertas zonas de necrosis en los túbulos dañados del grupo GM+DADS, no se puedan reabsorber ciertos iones como el sodio el cual por gradiente osmótico arrastra agua y concentra la orina; otra explicación podría ser que se encuentre alterada la función de la enzima Na^+/K^+ ATPasa presente en las células del túbulo proximal afectando la reabsorción de estos iones.

Para poder determinar la presencia del estrés oxidativo se midió el contenido de carbonilos, productos finales estables de las reacciones de oxidación que se originan por acción de las EROs sobre las proteínas convirtiendo algunos aminoácidos como leucina, valina, lisina, prolina, arginina, treonina e isoleucina a derivados carbonilo (67). El grupo tratado con GM presenta un elevado contenido en los grupos carbonilos debido a la producción de las especies reactivas de oxígeno y el DADS fue capaz de prevenir el incremento de dichos grupos probablemente a la capacidad que tiene como antioxidante atrapando tal vez las especies reactivas de oxígeno que se forman (53,54) o a un efecto inductor de las enzimas antioxidantes.

Se observó una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes en las ratas tratadas con GM ocasionando un incremento en los niveles de EROs, principalmente O_2^- y H_2O_2 , lo cual a su vez pudo inducir la inactivación de las enzimas Mn-SOD, GPx, GSH-Rx y CAT en la corteza renal de las ratas. El DADS fue capaz de prevenir la disminución en la actividad de las enzimas Mn-SOD, GPx, y GSH-Rx; sin embargo el DADS no fue capaz de prevenir la disminución de la enzima CAT, es más, el DADS por sí solo disminuyó la actividad de ésta enzima. En estudios previos se ha encontrado que la disminución en la actividad de la CAT, al utilizar polvo de ajo, es secundaria a la disminución en el contenido de la enzima (46,68). Por otra parte, es posible que el DADS en lugar de actuar directamente sobre las EROs, haya incrementado la actividad de otras moléculas antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) y la glutatión transferasa (GST) (49,69); ésta última se encuentra en mayor cantidad en el hígado; sin embargo, también se ha encontrado en células del túbulo proximal y en mucosa intestinal.

El nivel de protección que confiere el DADS también se puede observar en los cortes histológicos de corteza renal en donde claramente se observa que el grupo tratado con GM presenta un gran daño en los túbulos proximales con un alto contenido de necrosis celular y en el grupo tratado con DADS y GM el daño que se observa es mínimo. Con todo este conjunto de resultados se puede decir que el DADS, metabolito que se obtiene al ingerir ajo, es uno de los principales compuestos que le confieren la capacidad antioxidante junto con los demás compuestos azufrados que lo constituyen.

8. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que el DADS es capaz de disminuir el daño renal ocasionado por la administración de GM, lo cual se debe probablemente, a su capacidad de prevenir la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes así como a su capacidad de prevenir el estrés oxidativo gracias a sus propiedades antioxidantes. El DADS puede ser una de las moléculas derivadas del ajo que contribuya a explicar el efecto protector del polvo de ajo en la nefrotoxicidad ocasionada por GM.

REFERENCIAS

1. Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: Some recent research. *Gen. Pharmacol.* 1995;26:1477-1487.
2. Kahlmeter G, Dahlager JI. Aminoglycoside toxicity-a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *J. Antimicrob. Chemother.* 1984;13(Suppl. A):9-22.
3. Chambers HF, Sande MA. Aminoglucósidos; en Hardman JG, Limbid LE, Goodman Gilman A. Goodman & Gilman (eds). *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* México, McGraw Hill Interamericana 1996; pp 1173-1186.
4. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside nephrotoxicity: Cellular and molecular aspects. *Pharmacol.* 1987;1:40-44.
5. Walker PD, Barri Y, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J. Clin. Invest.* 1988;81:334-341.
6. Wellwood JM, Lovell D, Thompson AE, Tighe JR. Renal damage caused by gentamicin: A study of the effects on renal morphology and urinary enzyme excretion. *J. Pathol.* 1976;118:171-182.
7. Nakajima T, Hishida A, Kato A. Mechanisms for protective effects of free radicals scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am. J. Physiol.* 1994;266:F425-F431.
8. Ramsammy LS, Josepovitz C, Lane BP, Kaloyanides GJ. Polyaspartic acid protects against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989;250:149-153.
9. Luft FC, Patel V, Patel B, Kleit SA. Experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J. Lab. Clin. Med* 1975;86:213-220.
10. Wedeen RP, Batuman V, Cheeks C, Marquet E, Sobel H. Transport of gentamicin in rat proximal tubule. *Lab. Invest.* 1983;48:212-223.
11. Sastrasin M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD. Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982;222:350-358.

12. Silverblatt FJ, Kuehn C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney. Int.* 1979;15:335-345.
13. Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 1991;11:161-168.
14. Walker PD, Shah SV. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am. J. Physiol.* 1987;253:C495-C499.
15. Yang CL, Du XH, Han YX. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren. Fail.* 1995;17:21-26.
16. Ueda N, Guidet B, Shah SV. Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *Am. J. Physiol.* 1993;265:F435-439.
17. Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem. Pharmacol.* 1995;50:1749-1752.
18. Ali BH, Bashir AK. Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Gen. Pharmacol.* 1996;27:349-353.
19. Zentella M, Saldaña Y. Papel fisiológico de los radicales libres. *Biol. Educ. Bioq.* 1996;15:152-161.
20. Granados-Silvestre A. Efecto del ajo en polvo sobre el síndrome nefrótico y la hipertensión. Tesis de maestría en ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química UNAM, 1999.
21. Murav'ev RA, But PG, Fomina VA, Rogovin VV. The mechanism of bactericidal activity in phagosomes of neutrophils. *Izv Akad Nauk Ser. Biol.* 2002;4:437-441.
22. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1987;22:111-180.
23. Olinescu R, Smith TL. Free radicals in medicine. **New York, Nova Science Publishers, Inc.** 2002; pp 26-30.

24. Maldonado J. PD. **Nefrotoxicidad por gentamicina. Efecto protector del ajo y su relación con la superóxido dismutasa.** Tesis de maestría en Ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química UNAM, 2000.
25. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. **Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene.** *Gene* 1989;79:279-288.
26. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. **Renal antioxidant enzymes: their regulation and function.** *Kidney. Int.* 1994;45:1-9.
27. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. **Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney.** *J. Biochem.* 1991;109:918-923.
28. Ye B, Gitler C, Gressel J. **A high-sensitivity, single-gel, polyacrilamide gel electrophoresis method for the quantitative determination of glutathione reductases.** *Anal. Biochem.* 1997;246:159-165.
29. Guyton AC. **Tratado de Fisiología Médica.** México McGraw Hill Interamericana 1991; pp 296-301.
30. Pérez García V. **Efecto del dialil trisulfuro en la insuficiencia renal aguda experimental.** Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM, 2002.
31. Boullin DJ. **Garlic as a platelet inhibitor.** *Lancet* 1981;1:776-777.
32. Kiesewetter H, Jung F, Jung EM, Blume J, Mrowietz C, Birk A, Koscielny J, Wenzel E. **Effects of garlic coated tablets in peripheral arterial occlusive disease.** *Clin. Investig.* 1993;71:383-386.
33. Yang GC, Parvin M, Page Y. **Garlic as anti-oxidants and free radical scavengers.** *J. Food. Drug. Anal.* 1993;1:357-364.
34. Yin MC, Cheng WS. **Antioxidant activity of several Allium members.** *J Agric Food Chem.* 1998;46:4097-4101.
35. Block E. **The chemistry of garlic and onions.** *Sci. Am.* 1985;252:114-119.
36. Lawson LD. **Garlic. A review of its medicinal effects and indicated active compounds.** En: Lawson LD & Bauer R, eds. *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity.* American Chemical Society Symposium series 691, Washington, DC 1998; pp 176-209.

37. Fenwick GR, Hanley AB. The genus *Allium*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1985;22:273-377.
38. Lawson LD. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. En: Koch HP y Lawson LD, eds. *Garlic. The science and therapeutic application of Allium Sativum L. and related species.* Baltimore, M: Williams & Wilkins, 1996; pp. 37-107.
39. Rosen RT, Hiserodt RD, Fukuda EK, Ruiz RJ, Zhou Z, Lech J, Rosen SL, Hartman TG. Determination of allicin, S-allylcysteine and volatile metabolites of garlic in breath, plasma or simulated gastric fluids. *J. Nutr.* 2001;131:968S-971S.
40. Block E, Cai XJ, Uden PC, Quimby BD, Sullivan JJ. *Allium* chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl. Chem.* 1996;68:937-944.
41. Rosen RT, Hiserodt RD, Fukuda EK, Ruiz RJ, Zhou Z, Lech J, Rosen SL, Hartman TG. The determination of metabolites of garlic preparations in breath and human plasma. *Biofactors* 2000;13:241-249.
42. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Kuo WW, Tsai SJ, Lii CK. Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:378-383.
43. Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* 1994;60:417-420.
44. Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother. Res.* 1996;10:340-341.
45. Tsao SM, Yin MC. In vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J. Med. Microbiol.* 2001;50:646-649.
46. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández Pando R, Ibarra Rubio ME. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity relation to antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 29:602-611.

47. Cerón Toalá AC. Efecto protector del dialil sulfuro sobre la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2002.
48. Hyang SC, Hyun JK, Eun HC. Modulation of cytochrome P450-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene by volatile Allyl sulfides human hepatoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001;65:2205-2212.
49. Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidant system in rat liver and red blood cells. *Food Chem. Toxicol.* 2001;39:563-569.
50. Schaffer EM, Liu JZ, Green J, Dangler CA, Milner JA. Garlic and associated allyl sulfur components inhibit N-methyl-N-nitrosourea induced rat mammary carcinogenesis. *Cancer Lett.* 1996;102:199-204.
51. Sundaram SG, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1996;1315:15-20.
52. Omkumar RV, Kadam SM, Banerji A, Ramasarma T. On the involvement of intramolecular protein disulfide in the irreversible inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by diallyl disulfide. *Biochim. Biophys. Acta* 1993;1164:108-112.
53. Fanelli SL, Castro GD, Castro JA, de Toranzo EG. Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide; diallyl disulfide, allyl mercaptan and allyl methyl sulfide. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1998;102:163-174.
54. Yin MC, Hwang SW, Chan KC. Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:6143-6147.
55. Jung K, Priem F, Klotsek S, Becker S, Henke W. Methods compared for determining activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and spices effect. *Enzyme* 1991;45:215-221.

56. Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thomson AE. A note on the practical aspects of the assay of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase in human urine. *Clin. Chem. Acta* 1976;69:85-91.
57. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. Effect of the *in vivo* catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27:245-253.
58. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976;71:952-958.
59. Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin. Chem.* 1975;21:1136-1140.
60. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-363.
61. Aebi HE. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
62. Lowry OA, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-275.
63. Calberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 1975;250:5475-5480.
64. Iqbal J, Whitney P. Use of cyanide and diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic. Biol. Med.* 1991;10:69-77.
65. Duque I, Garcia-Escribano C, Rodriguez-Puyol M, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodriguez-Puyol D. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am. J. Physiol.* 1992;263:F466-473.
66. Dwivedi C, John LM, Schmidt DS, Engineer FN. Effects of oil-soluble organosulfur compounds from garlic on doxorubicin-induced lipid peroxidation. *Anticancer Drugs* 1998;9:291-294.
67. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257:1220-1224.
68. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Ibarra-Rubio Me. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol. Cell Biochem.* 2001;216:9-19.

69. Dwivedi C, Abu-Ghazaleh A, Guenther J. Effects of diallyl sulfide and diallyl disulfide on cisplatin-induced changes in glutathione and glutathione-S-transferase activity. *Anticancer Drugs* 1996;7:792-794.