



00524
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFEECTO DE S-ALILMERCAPTOCISTEINA SOBRE EL
SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO EN LA
NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR GENTAMICINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A :
LETICIA CASTRO CARDELAS



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Jurado asignando:

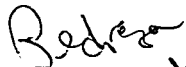
Presidente	Prof. Francisco Hernández Luis
Vocal	Prof. José Pedraza Chaverrí
Secretario	Prof. Marta Alicia Menjivar Iraheta
1 ^{er} . Suplente	Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
2 ^o . Suplente	Prof. Diana Barrera Oviedo


Sitio donde se desarrollo 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. 40009-M).

Asesor	Dr. José Pedraza Chaverrí
Sustentante	Leticia Castro Cardelas





DEDICATORIAS

*A mi mami (Juana Cardelas Sánchez), por tu amor y apoyo incondicional en todos estos años, porque gracias a ti, a todos tus desvelos, sacrificios y cuidados, he logrado concluir esta etapa de mi vida, nunca podré pagarte todo lo que has hecho por mí, espero no defraudarte, te quiero mucho. Este logro es tuyo.
Dios te bendiga siempre.*

*A mi papá (Rogelio R. Castro Olvera), porque a pesar de de las malas etapas que pasamos, de nuestras diferencias y pleitos, no dejaste de apoyarme.
Te quiero mucho, aunque a veces no lo parezca, porque nunca hemos tenido la costumbre de demostrarlo.
Gracias y que Dios te bendiga.*

A mi hermano (Rogelio R. Castro Cardelas), porque has sido una parte importante en mi vida y aunque siempre estamos molestandonos, sabes que te quiero mucho "mamano". Sigue siempre adelante y consigue todas tus metas, te deseo lo mejor del mundo. Dios te bendiga siempre.

*A mi amor (Luis A. Barrón García), porque has sido mi apoyo incondicional en todos estos años (¡8.5 años ya!), gracias por tu paciencia y tu amor, porque a pesar de todas las broncas y momentos difíciles sigues a mi lado, espero que superemos esta nueva etapa en nuestra relación para que sigamos juntos por mucho tiempo más, hasta hacernos "pasita".
Te amo y aunque hagas cara de fuchii:
Dios te bendiga siempre.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco antes que nada a Dios por darme la oportunidad de estar aquí y permitirme terminar esta etapa de mi vida.

Gracias a mis amigos del CBTis 202: Dianita, Yolanda (donde quiera que estes), Goyin y Abraham, porque con ustedes conocí realmente lo que es tener amigos.

Gracias a mis amigos: Samuel, Mayra, Cristina, Elly, Moy (y hasta el "pelón", alias Jorge), por brindarme su amistad y apoyo, sobre todo en los últimos semestres, por dejarme ser parte de sus vidas y darme la oportunidad de creer de nuevo en la gente.

Agradezco a mis amigos de primer semestre: el gordito (Juan Carlos), Rubén, Jonatlian, Rafita y Miriam, porque pasamos momentos muy padres y seguimos teniendo algún tipo de contacto.

Gracias a mis compañeros del laboratorio 209: Irasema (por todo lo que aprendimos juntas, sobre todo lo que no se debe hacer; gracias por tu amistad), Gaby, Mariana, Isaac (aunque sólo vengas a chacotear), Rosaura (aunque no te vea muy seguido por acá), Meche (gracias por tu paciencia y tu amistad), Omar (gracias por tener paciencia y estar siempre dispuesto a sacarnos de apuros), Diana (gracias por tu colaboración), Perla, Dra. Ibarra, Dra. Menjivar, Lety y Paty (aunque ya se haya ido de aquí).

Y en particular, gracias al Dr. Pedraza por su apoyo y ayuda.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	01
1.1	El riñón	01
1.1.1	Generalidades del riñón	01
1.1.2	Insuficiencia renal aguda (IRA)	02
1.1.2.1	Etiología	03
1.2	Gentamicina (GM)	03
1.2.1	Mecanismo de acción de la GM	04
1.2.2	Farmacocinética de la GM	04
1.2.3	Toxicidad de la GM	04
1.2.3.1	Nefrotoxicidad inducida por la GM : IRA	05
1.2.3.2	GM y especies reactivas de oxígeno	05
1.3	Especies reactivas de oxígeno (EROs)	06
1.3.1	Anión superóxido	07
1.3.2	Peróxido de hidrógeno	07
1.3.3	Radical hidroxilo	07
1.4	Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	08
1.5	Sistemas antioxidantes	09
1.5.1	Antioxidantes enzimáticos	09
1.5.1.1	Superóxido dismutasa (SOD)	10
1.5.1.2	Catalasa (CAT)	10
1.5.1.3	Glutatión peroxidasa (GPx)	11
1.5.1.4	Glutatión reductasa (GR)	12
1.5.2	Antioxidantes no enzimáticos	12
1.6	Ajo	14
1.6.1	Composición química	14
1.6.2	Propiedades	14
1.6.3	S-allylmercaptocisteína (SAMC)	15
1.6.3.1	Evidencias que respaldan las propiedades de la SAMC	16
2.	JUSTIFICACIÓN	18
3.	HIPÓTESIS	19
4.	OBJETIVO GENERAL	19
4.1	Objetivos particulares	19
5.	METODOLOGÍA	20
5.1	Reactivos	20
5.2	Determinaciones	20
5.2.1	Inmunohistoquímica de nitrotirosina (NT)	21
5.2.2	Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal	22
5.2.2.1	Catalasa (CAT)	22
5.2.2.2	Glutatión peroxidasa (cGPx)	23
5.2.2.3	Glutatión reductasa (GR)	24
5.2.2.4	Superóxido dismutasa (SOD total, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD)	24

5.2.3	Western blot de las enzimas antioxidantes	26
5.2.3.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE)	26
5.2.3.2	Transferencia	26
5.2.3.3	Western blot (W.B.)	27
5.2.3.3.1	CAT	27
5.2.3.3.2	Mn-SOD	27
5.2.3.3.3	CuZn-SOD	27
5.3	Análisis estadístico	28
6.	RESULTADOS	29
6.1	Inmunohistoquímica de NT	29
6.2	Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal	30
6.2.1	Actividad de CAT	30
6.2.2	Actividad de cGPx	31
6.2.3	Actividad de GR	31
6.2.4	Actividad de SOD total	32
6.2.5	Actividad de Mn-SOD	32
6.2.6	Actividad de Cu,Zn-SOD	33
6.3	Western Blot de las enzimas antioxidantes en corteza renal	33
6.3.1	W.B. de CAT	33
6.3.2	W.B. de Mn-SOD	34
6.3.3	W.B. de Cu,Zn-SOD	35
7.	DISCUSIÓN	36
8.	CONCLUSIÓN	39
	REFERENCIAS	40

RESUMEN

La gentamicina (GM) es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de los aminoglucósidos y es muy usado para el tratamiento de infecciones por bacterias gram negativas. Sin embargo, su uso se ha limitado debido a que uno de los efectos colaterales que presenta es la nefrotoxicidad; aproximadamente 10-15 % de los pacientes tratados con GM por más de 7 días presentan insuficiencia renal aguda. Se conoce desde tiempos muy antiguos que el ajo tiene muchas propiedades medicinales, algunas de las cuales se le han atribuido a su capacidad antioxidante. Particularmente en nuestro laboratorio se encontró que un compuesto del ajo, la S-alilmercaptocisteína (SAMC) previene la nefrotoxicidad inducida por gentamicina (GM) al disminuir el daño estructural y funcional renal y las proteínas oxidadas (marcador de estrés oxidativo). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es investigar si este compuesto antioxidante puede prevenir: (a) el estrés nitrosativo y (b) la disminución del sistema antioxidante enzimático inducidos por GM y así explicar, en parte, su efecto protector. Con este fin, se utilizaron bloques de riñón embebidos en parafina y fragmentos de corteza renal congelados de 4 grupos de ratas: 1) control (CT), 2) GM, 3) SAMC y 4) GM+SAMC administrados con los respectivos compuestos previamente en el laboratorio. A partir de los bloques embebidos en parafina se prepararon cortes histológicos de los riñones y se realizó una inmunohistoquímica de nitrotirosina (NT) para valorar el estrés nitrosativo. Se encontró un incremento de NT en el grupo tratado con GM, el cual fue prevenido por SAMC en el grupo GM+SAMC. Se prepararon homogeneizados de corteza renal para medir la actividad de las siguientes enzimas antioxidantes por métodos espectrofotométricos: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa citosólica (cGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa total y sus isoformas Mn-SOD y Cu,Zn-SOD. La actividad de la enzima CAT disminuyó en los grupos tratados con GM, SAMC y GM+SAMC; la actividad de cGPx y GR disminuyó significativamente en el grupo tratado con GM; la Mn-SOD mostró una tendencia a disminuir con GM pero no alcanzó significancia estadística; la actividad de SOD total y Cu,Zn-SOD no se modificó con ninguno de los tratamientos. También se midió en homogeneizados de corteza renal el contenido de las enzimas antioxidantes CAT, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD por western blot. La CAT mostró una clara tendencia a disminuir en el grupo GM, y disminuyó significativamente en los grupos SAMC y GM+SAMC; el contenido de Mn-SOD y Cu,Zn-SOD no disminuyó. El tratamiento con SAMC, en el grupo GM+SAMC, no logró prevenir la disminución de la actividad y el contenido de CAT, pero sí previno parcialmente la disminución de la actividad de cGPx, totalmente la actividad de GR y la tendencia a disminuir que mostró la actividad de Mn-SOD. La SAMC *per se* fue incapaz de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes o de alterar el estrés nitrosativo en el grupo SAMC. Estos resultados sugieren que el efecto protector que muestra la SAMC en la nefrotoxicidad por GM está también asociado a la atenuación del estrés nitrosativo y a la prevención de la disminución de algunas enzimas antioxidantes. De tal modo que la SAMC es uno de los compuestos del extracto de ajo envejecido que contribuyen a explicar su efecto protector.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL RIÑÓN

1.1.1 Generalidades del riñón

El riñón es un órgano situado en la parte posterior del abdomen a cada lado de la columna vertebral, sus dimensiones en el humano son aproximadamente de 12x7x3 cm, el peso de cada riñón es de 125-170 g en el hombre y de 115-155 g en la mujer. Se distinguen dos regiones principales en un corte transversal: una pálida y externa que corresponde a la corteza, y otra más oscura e interna que corresponde a la médula (1) (Fig. 1). Las principales funciones del riñón son: 1)eliminar la mayoría de los productos metabólicos terminales del organismo y sustancias extrañas, 2)controlar las concentraciones de la mayor parte de los componentes de los líquidos corporales y 3) la producción y secreción de enzimas y hormonas.

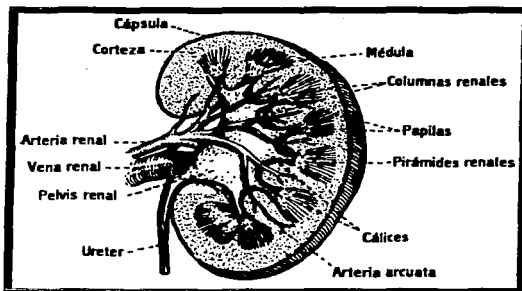


Fig. 1. Estructura del riñón.

Los dos riñones, en conjunto, tienen aproximadamente dos millones de nefronas y cada una es capaz de formar orina por separado. La nefrona es la unidad funcional del riñón y consta principalmente de un glomérulo, cápsula de Bowman, túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector (Fig. 2). Los principales mecanismos mediante los cuales la nefrona depura el plasma son: filtración, reabsorción y secreción. La formación de la orina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

comienza con la sangre que entra por la arteriola aferente al glomérulo situado en la corteza renal y la presión de la sangre hace que el líquido se filtre hacia la cápsula de Bowman, pasando como ultrafiltrado al túbulo proximal en la corteza y posteriormente al asa de Henle la cual penetra hasta la médula. Tras pasar esta estructura, el líquido entra en el túbulo distal el cual está ya en la corteza renal, donde se unen varios túbulos distales para formar el túbulo colector. Los túbulos colectores se van uniendo para formar unidades más grandes que penetran hacia la médula, siendo que los más grandes drenan en la pelvis renal a través de las puntas de las papilas renales. A medida que el filtrado fluye por el sistema tubular, especialmente el agua y electrolitos son reabsorbidos de nuevo hacia el plasma (sistema vascular), secretándose al mismo tiempo algunas sustancias desde el propio plasma hacia la luz tubular. De este modo, la orina formada está compuesta principalmente por el agua restante, sustancias filtradas y pequeñas cantidades de sustancias secretadas (2).

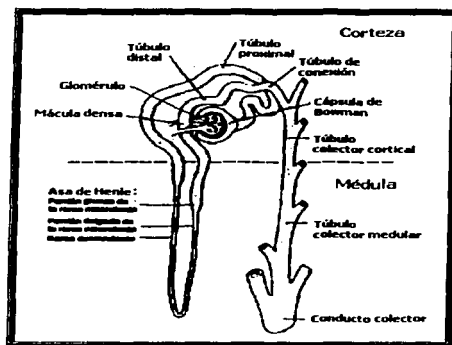


Fig. 2. Estructura de la nefrona.

1.1.2 Insuficiencia renal aguda (IRA)

Es un síndrome caracterizado por una disminución abrupta en la velocidad de filtración glomerular, resultando en la acumulación de productos finales del metabolismo tales como urea (medida como nitrógeno de urea, conocido como BUN) y creatinina. La IRA es usualmente

asintomática y se detecta cuando a los pacientes se les realiza un perfil bioquímico, el cual revela un incremento en los niveles séricos de BUN y creatinina, a lo que se conoce como azotemia; aunque menos frecuente, también puede ser reconocida por el desarrollo de oliguria (volumen de orina < 400 mL/d) (3).

1.1.2.1 Etiología

La IRA puede clasificarse según sus causas de la siguiente manera (3,4):

1. Pre-renal: es secundaria a la disminución de la irrigación sanguínea del riñón, de tal modo que la alteración se produce antes de llegar al riñón. Esto puede deberse a hipovolemia, disminución del gasto cardíaco, vasodilatación sistémica, vasoconstricción renal, agentes farmacológicos que dañan la autorregulación, entre otras causas.
2. Intra-renal: se produce por alteraciones en el interior del riñón. Entre las causas están las enfermedades que involucran las arterias y venas renales, enfermedades del glomérulo y la microvasculatura renal, enfermedades caracterizadas por daño prominente a los túbulos renales frecuentemente con necrosis tubular aguda y enfermedades agudas del intersticio tubular.
3. Post-renal: es secundaria a una obstrucción del sistema colector de la orina en algún lugar entre los cálices y el tracto de salida de la vejiga. Esto puede ser por una obstrucción de los ureteres, obstrucción del cuello de la vejiga u obstrucción uretral.

1.2 GENTAMICINA (GM)

La gentamicina (GM) es un antibiótico de primera elección y de amplio espectro muy usado para el tratamiento de infecciones por bacterias gram negativas (5), entre las que se encuentran *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Neisseria* (6). Este antibiótico es obtenido de especies del actinomiceto *Micromonospora*. Pertenece a la familia de los aminoglucósidos y en su estructura contiene dos aminoazúcares (purpurosamina y garosamina) unidos por enlaces glucosídicos a una hexosa o aminocitol (2-desoxiestreptamina). Dependiendo de la metilación que tenga la purpurosamina, se generan tres tipos de gentamicinas (7) (Fig. 3).

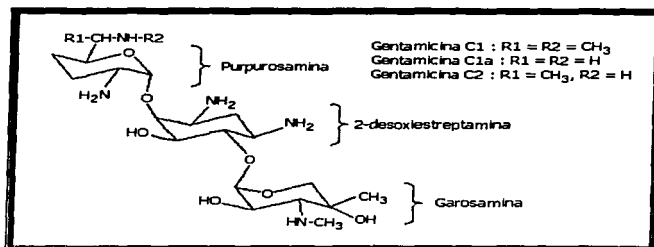


Fig. 3. Estructura química de la Gentamicina.

1.2.1 Mecanismo de acción de la GM

Difunde por medio de canales acuosos formados por porinas, penetra en la membrana citoplásmica y se liga a la subunidad ribosómica 30 S interfiriendo en la síntesis de proteínas, lo que causa una lectura errónea y la terminación prematura de la traducción. De este modo, las proteínas aberrantes producidas, se insertan en la membrana alterando la permeabilidad, esto permite el paso de más GM y deja escapar moléculas esenciales para la bacteria (7).

1.2.2 Farmacocinética de la GM

La GM es una molécula policatiónica altamente polar. No se absorbe en el tracto gastrointestinal, pero es rápidamente absorbida por vía intramuscular o subcutánea. Su vida media en plasma sanguíneo es de 1 a 4 horas en humanos y de 30 minutos en animales pequeños de laboratorio. Su unión a las proteínas plasmáticas es mínima; esencialmente es eliminada por filtración glomerular y parcialmente reabsorbida por células del túbulo proximal (5,8).

1.2.3 Toxicidad de la GM

El uso de la GM se ve limitado por presentar efectos nefrotóxicos y ototóxicos (9,10). La nefrotoxicidad como efecto colateral es más común, ocurre en 8-26% de los pacientes hospitalizados que reciben aminoglucósidos incrementando la permanencia en el hospital y los costos médicos, se desarrolla después de periodos relativamente cortos de tratamiento y estos efectos, son reversibles si es interrumpida la administración del antibiótico (7,10-13).

La nefrotoxicidad se caracteriza por necrosis tubular principalmente en los túbulos proximales sin cambios morfológicos en las estructuras glomerulares, hay una marcada disminución en la velocidad de filtración glomerular, lo que ocasiona IRA (14-17).

1.2.3.1 Nefrotoxicidad inducida por GM : IRA

Aproximadamente 10-15% de los pacientes tratados con GM desarrollan IRA (18). La GM es transportada a los túbulos proximales a través de la membrana de borde en cepillo (luminal) o basolateral (vascular) por pinocitosis, y es acumulada en lisosomas (19-22). La entrada en la membrana esta mediada por interacciones electrostáticas entre la carga positiva de la GM y la carga negativa de los fosfolípidos ácidos (principalmente fosfatidilinositol) (21,23-26); además se ha demostrado que también la megalina, la cual es un receptor de LDL y es miembro de la familia de glicoproteínas, media en parte, la entrada celular de los aminoglucósidos (6,27-30). Después de la endocitosis, la GM se acumula en lisosomas, estos se hinchan por deposición de material lipídico (detritus), dando una apariencia de cuerpos mieloides al ser observados por microscopía electrónica (24-26,31-34). Dado que la GM se acumula en los lisosomas de los túbulos proximales y su vida media en el tejido cortical es de aproximadamente 100 horas, se daña la función de estos organelos contribuyendo a la nefrotoxicidad (35,36).

Se han propuesto varias hipótesis para entender los mecanismos mediante los cuales los aminoglucósidos causan nefrotoxicidad, entre estos se encuentran: alteración del metabolismo de fosfolípidos provocando su acumulación y formación de cuerpos mieloides, inhibición de fosfolipasas A y C (esto puede interferir con procesos de transducción de señales) (25,26,32,37,38), disminución de la actividad de la ATPasa Na⁺-K⁺ y la esfingomielinasa (39-41), inhibición de la síntesis de proteínas microsomales (42-44), entre otros. Como consecuencia de lo anterior, se han observado alteraciones patofisiológicas en la membrana apical, membrana basolateral, retículo endoplásmico, lisosomas, mitocondria y microsomas, conduciendo eventualmente a la muerte celular (23,45,46).

1.2.3.2 GM y especies reactivas de oxígeno

Los mecanismos exactos de la inducción de IRA por GM aún no están completamente claros, pero hay evidencias *in vitro* e *in vivo* (47) que han implicado a las EROs como mediadoras de este daño:

Se ha observado que la GM aumenta la generación de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo por la mitocondria cortical *in vitro* (48,49), incrementa la generación del radical hidroxilo *in vivo* (50) e incrementa la peroxidación de lípidos en la corteza renal de ratas (51-53). Además, se ha encontrado que la GM induce la liberación del hierro de la mitocondria cortical, y este en combinación con la GM, causa peroxidación de lípidos y generación de radicales libres (54,55). Por otro lado, se ha visto que la administración de algunos atrapadores del radical hidroxilo, tales como dimetiltiourea (DMTU), dimetil sulfoxido (DMSO) y benzoato de sodio, de quelantes de hierro como la deferoxamina (DFO), de antioxidantes como la vitamina E, selenio, superóxido dismutasa y compuestos de ajo, entre otros, disminuyen los efectos nefrotóxicos (49,50,56-59).

1.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)

Se conoce como especies reactivas de oxígeno (EROs) a moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno. Los radicales libres, son especies químicas que tienen un electrón desapareado, siendo los de mayor interés los derivados del oxígeno y son frecuentemente llamadas EROs y viceversa, utilizando estos dos términos como equivalentes. Debido a esto, el término EROs incluye a metabolitos de oxígeno que pueden ser o no radicales libres. Cuando hay un desequilibrio entre la producción de EROs y las defensas antioxidantes, se origina el *estrés oxidativo*, en el cual existe daño celular que puede llegar a ser muy severo y puede conducir a la muerte celular; este, puede ser debido a un incremento de EROs, a una disminución de las defensas antioxidantes o a ambas (60).

Estas especies son formadas y degradadas por todos los organismos aeróbicos, ya que son requeridos para la función celular normal. En los sistemas biológicos se lleva a cabo una reducción parcial del oxígeno molecular vía univalente y de un modo secuencial, conduciendo a la generación de las EROs: ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) (61) (Fig. 4). Las EROs pueden reaccionar fácilmente con biomoléculas y dañanlas, tales como, lípidos, proteínas y ADN (62).

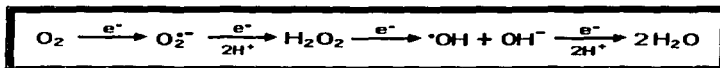


Fig. 4. Reducción univalente del oxígeno.

Pero las especies mostradas anteriormente, no son las únicas ya que se pueden formar otras por vías alternas. De tal modo que entre las EROs que son radicales tenemos al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), radical peróxido ($\cdot OOR$), radical hidropéroxido ($\cdot OOH$), radical alcóxido ($\cdot OR$); entre los no radicales encontramos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3) y oxígeno singulete ($\cdot O_2$) (62).

1.3.1 Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Se forma por adición de un electrón al oxígeno molecular y a pesar de ser un radical libre no es altamente reactivo. Se forma espontáneamente en medios aerobios ricos en electrones como es el caso de la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial. También es producido por la xantina oxidasa, lipooxigenasa y ciclooxigenasa. La NADPH oxidasa de fagocitos lo forma como mecanismo de defensa contra organismos extraños, generalmente bacterias. El $O_2^{\cdot-}$ no tiene la capacidad de penetrar las membranas lipídicas, por lo que se queda encerrado en el compartimento donde es producido (60,63).

1.3.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Este no es un radical libre, pero es muy importante debido a su habilidad de penetrar membranas biológicas y así difundir a otros organelos. Es producido a partir del $O_2^{\cdot-}$ vía superóxido dismutasa, también a partir de la NADPH oxidasa (en neutrófilos), glucosa oxidasa y xantina oxidasa (61). Juega un papel muy importante como intermediario en la producción de otras EROs, como es el caso del radical hidroxilo (vía metales de transición, Fig. 5) y el ácido hipocloroso (por la acción de la mieloperoxidasa presente en los fagocitos de neutrófilos). Tiene una función importante fisiológicamente como molécula de señalización intracelular (64,65).

1.3.3 Radical hidroxilo ($\cdot OH$)

El radical hidroxilo es altamente reactivo causando más daño que cualquier otra ERO, pero es muy inestable, de modo que su tiempo de vida media es muy corto e interactúa con las moléculas más cercanas a él. Es formado a partir del H_2O_2 en la reacción de Fenton catalizada por metales de transición, y el $O_2^{\cdot-}$ recicla los metales, de modo que la suma de ambas reacciones es conocida como la reacción de Haber-Weiss (66,67) (Fig. 5).

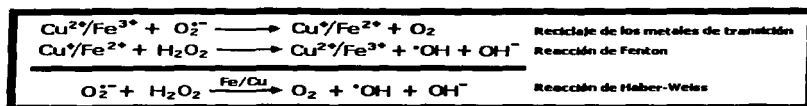


Fig. 5. Reacción de Haber-Weiss.

1.4 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (RNS)

Las especies oxidantes reactivas que contienen al átomo de nitrógeno, de modo análogo a las EROs, son conocidas como especies reactivas de nitrógeno (RNS) y cuando estas alcanzan un umbral crítico y hay reacciones nitrosativas incontroladas surge un fenómeno conocido como *estrés nitrosativo*. Entre estas especies se encuentran los radicales: óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), y los no radicales: ácido nitroso (HNO_2), catión nitronium (NO_2^+), catión nitrosilo (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), tetróxido de dinitrógeno (N_2O_4), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), peroxinitrito (ONOO^-) y alquilperoxinitritos (ROONO) (68).

El $\text{NO}\cdot$ es sintetizado enzimáticamente durante el metabolismo oxidativo de la L-arginina a L-citrulina por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Fig. 6). A concentraciones fisiológicas, el $\text{NO}\cdot$ funciona principalmente como segundo mensajero intracelular, siendo una de sus cualidades más conocidas el actuar como factor relajante del músculo liso (69).

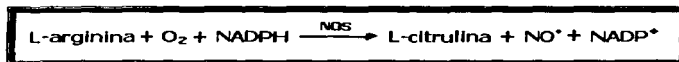


Fig. 6. Síntesis del óxido nítrico.

El $\text{NO}\cdot$ no reacciona fácilmente con biomoléculas a pesar de tener un electrón desapareado, sin embargo, lo hace con otros radicales libres (por ejemplo, radicales peroxilo y alquilo), generando moléculas menos reactivas, por lo que funciona como un atrapador de radicales libres (61). Pero, si el O_2^- es producido en grandes cantidades paralelamente con el $\text{NO}\cdot$, los dos reaccionan entre sí produciendo OONO^- (peroxinitrito) (Fig. 7), éste y su conjugado ácido (OONOH) son altamente tóxicos y oxidantes y se ha mostrado que causa peroxidación de lípidos y citotoxicidad (70). En la presencia de O_2 o de O_2^- , el $\text{NO}\cdot$ reacciona con estas especies generando otras RNS como el $\text{NO}_2\cdot$ y N_2O_3 , los cuales son también agentes nitrosantes que reaccionan con grupos sulfhidrilos para formar S-nitroso derivados, así como oxidación de

componentes intracelulares (68). En la siguiente figura (Fig. 7), se muestra la formación de algunas RNS.

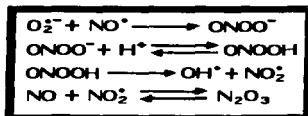


Fig. 7. Formación de peroxinitrito y otras RNS.

El peroxinitrito es particularmente un oxidante efectivo de moléculas aromáticas y compuestos organosulfurados que incluyen aminoácidos y residuos de péptidos. La cisteína y el glutatión (componentes de reservorios antioxidantes) son convertidos a disulfuros. La tirosina y el triptofano experimentan oxidaciones de un electrón a cationes radicales, los cuales son competitivamente hidroxilados, nitrados y dimerizados. La formación de *nitrotirosina* (NT) es particularmente favorable, y la aparición de este producto en muestras biológicas se considera una consecuencia de la exposición a peroxinitrito. La nitración de tirosina puede conducir a disfunción de las proteínas nitradas, tal como se ha mostrado o sugerido en el caso de superóxido dismutasa, actina, tirosina hidroxilasa neuronal, citocromo P450 y prostaciclina sintasa (71).

1.5 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Para contrarrestar los efectos letales de la excesiva formación de EROs, los organismos biológicos cuentan con sistemas de defensa antioxidantes, los cuales se dividen en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Estos actúan al impedir la formación de las EROs, al evitar la oxidación de un determinado sustrato susceptible a sufrir una oxidación o al reaccionar con ellas para formar especies menos reactivas.

1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

Entre las enzimas principales se encuentran: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, entre otras.

1.5.1.1 Superóxido dismutasa (SOD) (óxido reductasa EC 1.15.1.1)

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima que cataliza la conversión (dismutación) del anión superóxido a H_2O_2 y a oxígeno molecular (Fig. 8). En las células eucariotas está presente en 3 isoformas productos de genes diferentes: dos de éstas contienen cobre y zinc (Cu y Zn) en su sitio activo y la otra contiene manganeso (Mn). Una de las que contiene cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) es dimerica con un peso de 32 KDa (en humanos), se encuentra en citoplasma y núcleo (72); la otra es conocida como SOD extracelular (EC-SOD) y es tetramérica con 25 KDa por subunidad (en mamíferos), se encuentra en plasma, linfa y líquido sinovial (73), tiene alta afinidad por la heparina y sulfato de heparán en la superficie celular endotelial; en la rata esta isoforma es un dímero de 85 KDa el cual no tiene afinidad por la heparina (74). La que contiene Mn (Mn-SOD) es tetramérica, pesa 80 KDa y se encuentra en mitocondria (75).

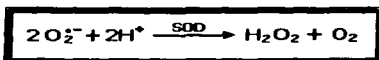


Fig. 8. Reacción catalizada por la SOD.

La SOD no es una enzima propiamente desintoxicante, debido a que el producto que forma (H_2O_2), causa también daño celular; sin embargo, este es el primer paso de la cascada enzimática para la de inactivación de la EROs, ya que a continuación la enzima que actúa es la catalasa.

1.5.1.2 Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

Esta enzima es una hemoproteína tetramérica con peso molecular de 240 KDa, con cuatro ferriprotoporfirinas por tetrámero y una molécula de NADPH unida a cada subunidad (76), la cual cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno (Fig. 9). Su vida media en circulación es relativamente corta, de 6 a 8 minutos, en tejidos de mamíferos está presente en altas concentraciones en hígado, riñón y en bajos niveles en tejido conectivo (77). En las células, está presente principalmente en los peroxisomas (80%) y mitocondrias (78).



Fig. 9. Reacción catalizada por la CAT.

1.5.1.3 Glutatión peroxidasa (GPx) (glutatión:H₂O₂ oxidoreductasa EC 1.11.1.9)

Esta enzima cataliza la reducción del H₂O₂ y de hidroperóxidos orgánicos (Fig. 10), protegiendo así a las células del daño oxidativo. Para llevar a cabo esta reacción, la GPx utiliza glutatión reducido (GSH) como sustrato y este pasa a glutatión oxidado (GSSG) (61).

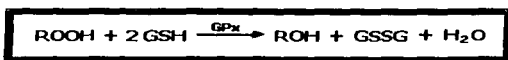


Fig. 10. Reacción catalizada por la GPx.

Se han encontrado diferentes isoformas de esta enzima, siendo que todas tienen un átomo de selenio unido a una cisteína en su sitio activo:

· *Glutatión peroxidasa citosólica (cGPx)* : esta selenoenzima está presente en casi todos los tejidos pero irregularmente distribuida. Es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades idénticas de 22 KDa cada una, cataliza la reducción del H₂O₂ y de hidroperóxidos de lípidos (79).

Glutatión peroxidasa gastrointestinal (GI-GPx) : es similar a la anterior, ya que es citosólica, tiene cuatro subunidades idénticas de 22 KDa y cataliza la reducción de varios peróxidos. Sin embargo, esta enzima es tejido-específica, ya que en ratas se ha encontrado solamente en tracto gastrointestinal (TGI) y en humanos en el TGI e hígado; debido a esto, puede ser un componente principal en la defensa contra hidroperóxidos de lípidos ingeridos e importante para la prevención de cáncer (80).

Glutatión peroxidasa plasmática (pGPx): es un tetrámero con subunidades de 23 KDa aproximadamente. Difiere de las dos anteriores en que esta es una glicoproteína (selenoglicoproteína) y esta presente en los fluidos extracelulares (81). Está presente en varios tejidos, de donde es secretada a los fluidos extracelulares, pero el riñón tiene la más alta concentración y es el principal sitio de producción de esta enzima (82). También, cataliza la reducción de varios peróxidos, aunque su actividad es solamente del 10% de la cGPx (81).

Glutatión peroxidasa de hidroperóxidos fosfolípidos (PHGPx) : a diferencia de las anteriores, esta selenoenzima es un monómero de 19.7 KDa. Se encuentra en tejidos en forma citosólica y

asociada a membranas (83). Puede reducir directamente hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol, siendo considerada un factor importante en la protección contra la destrucción oxidativa de las biomembranas (84). Se ha sugerido que puede tener funciones importantes en la regulación redox de varios procesos, como inflamación, apoptosis y espermatogénesis (85).

1.5.1.4 Glutatión reductasa (GR) (EC 1.6.4.2)

Esta enzima se localiza en citoplasma y mitocondria (86). Es una enzima muy importante que actúa en conjunto con la GPx formando un ciclo redox y requiere NADPH para reciclar el GSSG y reducirlo a GSH, impidiendo que se agoten las reservas de GSH; los niveles de NADPH son regenerados por la acción de las enzimas málica y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (87). La reducción que cataliza la GR por medio de dos reacciones, es mostrada en la siguiente figura (Fig. 11), en donde GR-(SH)₂ y GR-S₂ corresponden a las formas reducida (ditiol) y oxidada (disulfuro) de la enzima (87):

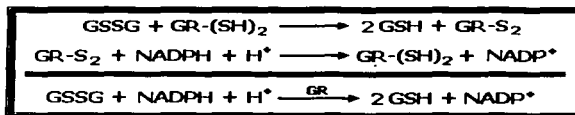


Fig. 11. Reacción catalizada por la GSH-Rx.

1.5.2 Antioxidantes no enzimáticos

Estos sistemas se pueden clasificar a su vez, en sistemas hidrosolubles y liposolubles, y también tienen la capacidad combatir al estrés oxidativo. Sus características son brevemente mencionadas en las tablas siguientes (tablas 1 y 2) (88):

Tabla 1. Antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles.

<i>ANTIOXIDANTE</i>	<i>COMENTARIOS</i>	<i>MODO DE ACCIÓN</i>
Glutión	Es un tri péptido intracelular: ácido glutámico-cisteína-glicina	Es sustrato de la GPx; atrapa $\cdot\text{OH}$, HOCl, OONO \cdot , RO \cdot , RO $_2\cdot$, etc; quela Cu; previene la oxidación de proteínas con grupos -SH; está involucrado en muchos otros procesos metabólicos y recicla otros antioxidantes.
Vitamina C	Estructura química: ácido ascórbico; se encuentra de modo intracelular	Recicla el α -tocoferol, reduce peróxidos y EROs tales como O $_2\cdot^-$, previene la formación de hidroperóxidos, etc.
Ácido úrico	Es producto final de la degradación de los ácidos nucleicos y se encuentra extracelularmente	Es atrapador de EROs y RNS, por ejemplo: RO $_2\cdot$, $\cdot\text{OH}$, NO $_2\cdot$ y O $_3\cdot$; protege contra la nitración; quela Fe y Cu
Flavonoides y otros fenoles de plantas		Inhiben las lipooxigenasas atrapando radicales peroxilo, pueden unirse a metales de transición, etc.

Tabla 2. Antioxidantes no enzimáticos liposolubles.

<i>ANTIOXIDANTE</i>	<i>COMENTARIOS</i>	<i>MODO DE ACCIÓN</i>
Carotenoides	Sirven como precursores de la vitamina A (o retinol)	<i>In vitro</i> actúan como atrapadores de radicales libres, <i>in vivo</i> es incierto su mecanismo
Vitamina E	Se localiza de modo extracelular y en las membranas; se conoce también como α -tocoferol	Actúa como atrapador de radicales peroxilo inhibiendo la lipoperoxidación
Bilirrubina	Es el producto final de la degradación del grupo hemo	<i>In vitro</i> atrapa radicales peroxilo y oxígeno singulete; <i>in vivo</i> unida a la albumina la protege contra EROs
Ácido lipoico	Se ha encontrado en tejidos y fluidos corporales, mitocondria y sangre	Quela metales; atrapa radicales libres (RO $_2\cdot$, HOCl, OH \cdot y ONOOH \cdot); regenera otros antioxidantes (GSH, ascorbato, vit. E)

1.6 AJO

El ajo es una de las plantas que desde hace muchos años se ha empleado en todo el mundo, no sólo como condimento en la cocina, sino como remedio en la medicina popular, debido a las múltiples propiedades que posee. Pertenec a la familia *Alliaceae* y su nombre científico es *Allium sativum* (89).

1.6.1 Composición química

La más sobresaliente de sus características es su alto contenido de compuestos organosulfurados (11-35 mg/g peso fresco), 99.5% de los cuales contienen el aminoácido sulfurado *cisteína*. Casi todo el azufre (95%) en los dientes de ajo enteros se encuentra con abundancia similar en dos clases de compuestos principales: los S-alquil cisteína sulfóxidos y las γ -glutamil S-alquil cisteínas. Ambos, están sustituidos en el átomo de azufre con un grupo alilo (2-propenilo), isoalilo (trans-1-propenilo) o por grupos metilo. El compuesto más abundante es la alina (sulfóxido de S-alil cisteína) y representa el 80% del total de los S-alquil sulfóxidos de cisteína. La alina se encuentra compartimentalizada en las células mesofílicas y cuando el ajo es triturado o cortado, entra en contacto con la enzima vacuolar alinasa que actúa sobre ella para formar la alicina y ésta debido a su inestabilidad y a diferentes condiciones de tratamiento da lugar a otros compuestos. Por otra parte, las γ -glutamil cisteínas, son precursoras de la alina e isoalina durante la germinación de la planta, y por medio de una vía diferente son convertidas a tiosulfonatos que originaran a su vez otros compuestos (89).

1.6.2 Propiedades

La mayoría de las investigaciones analíticas y farmacológicas del ajo están enfocadas a los compuestos organosulfurados, debido no sólo a su abundancia como ya se mencionó, sino porque se le atribuyen los efectos que produce esta planta, entre los cuales estan los mostrados en la tabla 3 (90).

Tabla 3. Estudios farmacológicos del ajo (1900-1996).

<i>EFFECTOS</i>	<i>TOTAL DE ESTUDIOS</i>	<i>ESTUDIOS EN HUMANOS</i>
Cardiovascular	344	104
Lípidos en sangre	179	62
Presión sanguínea	78	18
Fibrinólisis, coagulación, flujo	51	18
Agregación plaquetaria	76	6
Aterosclerosis (formación de ateromas)	23	2
Antimicrobiano	252	35
Cáncer	221	12
Antioxidante	60	4
Hipoglucémico	28	3
Estimulación del sistema Inmune	15	3
Antiinflamatoria	11	1
Padecimientos gastrointestinales	43	27
Respiratorio	11	5
Antídoto contra envenenamiento con metales pesados	28	1
Otros 18 efectos	145	12
Total de estudios farmacológicos	1158	208

Los diferentes compuestos azufrados se han estudiado en diferentes preparaciones del ajo, entre las que se encuentran principalmente extracto de ajo envejecido (EAE) y ajo deshidratado, los cuales se encuentran en diferentes preparaciones farmacéuticas.

1.6.3 S-allylmercaptocisteína (SAMC)

La SAMC (209 g/mol), es un compuesto que se encuentra en cantidades sumamente pequeñas (0.002 mg/g peso fresco) en el ajo cortado, pero, es uno de los compuestos que se encuentran en mayor proporción en el (EAE). Este extracto se prepara al almacenar el ajo cortado en trocitos en etanol acuoso al 15-20 % por 20 meses aproximadamente, seguido por filtración y concentración; de este modo, la concentración de la SAMC va incrementándose en el transcurso del envejecimiento del extracto de ajo, donde parte de una concentración de 0.01 mg/g de extracto seco hasta llegar a 1.9 mg/g a los 24 meses (89).

Los tiosulfonatos o la alicina pueden reaccionar con los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos o con la cisteína, para formar la SAMC y otros compuestos como se muestra en la siguiente figura (Fig. 12) (89).

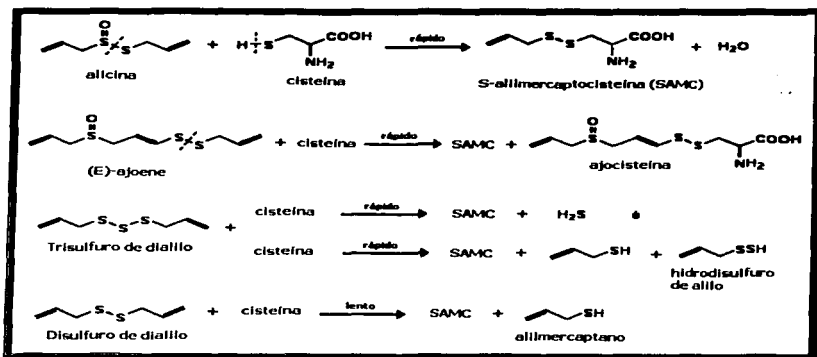


Fig. 12. Formación de SAMC mediante la reacción de cisteína con alicina y sus derivados (89).

1.6.3.1 Evidencias que respaldan las propiedades de la SAMC

Se ha encontrado que el EAE y sus constituyentes, entre los que se encuentran la SAMC y SAC (S-allylcisteína) principalmente, reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, inhiben el daño al ADN y la mutagénesis, tienen acciones preventivas contra cáncer, previenen el daño en el hígado contra agentes tóxicos y tienen actividad antioxidante; esta última, debida a su capacidad para atrapar radicales e inhibir la formación de lipoperóxidos y la oxidación de LDL (91-96). Específicamente en el caso de la SAMC se ha observado que tiene efectos antiproliferativos, protección anticancerígena incluyendo colon y próstata, disminuye la presión intraocular y protege contra hepatotóxicos como acetaminofén, tetracloruro de carbono y D-galactosamina, además de tener efectos antioxidantes (93,97-100).

En cuanto a sus efectos antioxidantes, se ha reportado que la SAMC disminuye el daño hepático causado por hepatotóxicos como el CCl₄ y la D-galactosamina en cultivos de hepatocitos de rata primarios (94); previene la lipoperoxidación hepática y la disminución del GSH causados por el acetaminofén en ratas (100). *In vitro*, tiene actividad atrapadora de radicales (demostrado mediante un ensayo donde atrapa el radical 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH)), tiene la capacidad de disminuir la lipoperoxidación (demostrado por la producción de malondialdehído (MDA), el cual es medido con el ácido tiobarbitúrico) y disminuye la

quimioluminiscencia debida al t-butil hidroperóxido (93). Además, se ha reportado que tiene la capacidad de inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) *in vitro*, inducida por la incubación con CuSO₄ (101).

Particularmente en nuestro laboratorio, se llevó a cabo un protocolo, en donde se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 g (9-10 semanas de edad). Al grupo control (CT) se le administró 0.5 % de carboximetilcelulosa (vehículo de SAMC) vía intragástrica cada 12 h. Al grupo con gentamicina (GM) se le administró una dosis de 70 mg/Kg de peso de GM vía subcutánea cada 12 h (se utilizó la presentación comercial Garamicina® solución inyectable de 160 mg/2 mL de Schering-Plough, lote no. 2DPDAA012, México, D.F.). Al grupo de S-allmercaptocisteína (SAMC) se le administró 50 mg/Kg de peso de SAMC vía intragástrica cada 12 h (la SAMC, lote no. 020328, fue un regalo de la compañía Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., Hiroshima, Japón). Al grupo GM+SAMC se le administró 50 mg/Kg de peso de SAMC vía intragástrica cada 12 h y 30 minutos después 70 mg/Kg de peso de GM vía subcutánea cada 12 h. El tratamiento se llevó a cabo durante 4 días, al final de los cuales se sacrificaron las ratas por decapitación (102).

En este protocolo se encontró que la SAMC previene parcialmente el daño renal funcional y estructural causado en la nefrototoxicidad inducida por GM en ratas (donde están implicadas las EROs), sugiriendo las propiedades antioxidantes de la SAMC con los siguientes valores (tabla 4) (102).

Tabla 4. Propiedades protectoras de SAMC en la nefrototoxicidad inducida por GM.

	CT	GM	SAMC	GM+SAMC
Depuración de creatinina (mL/min)	1.09±0.15	0.49±0.06 ^a	0.91±0.09	0.96±0.04 ^b
BUN (mg/dL)	21.2±1.5	49.1±1.3 ^a	21.6±0.8	32.1±2.2 ^{a,b}
Proteinuria (día 4) (mg/24h)	13.5±1.1	48.3±6.7 ^a	9.7±1.1	25.0±1.6 ^b
NAG (U/24h)	0.12±0.04	2.65±0.52 ^a	0.04±0.03	0.78±0.06 ^b
pGPx (U/mL)	1.45±0.14	0.57±0.17 ^a	1.41±0.07	1.12±0.07 ^b
Proteínas oxidadas (nmol/mg prot)	10.0±0.3	15.2±0.5 ^a	10.2±0.4	8.9±0.4 ^b

Valores promedio ± error estándar; n = 4-5; a = p < 0.01 vs. CT, b = p < 0.05 vs. GM.

2. JUSTIFICACIÓN

La gentamicina (GM) es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de los aminoglucósidos y es muy usado para el tratamiento de infecciones por bacterias gram negativas (5). Sin embargo, su uso se ha limitado debido a que uno de los efectos colaterales que presenta es la nefrotoxicidad; de hecho, se ha informado que aproximadamente 10-15% de los pacientes tratados con GM por más de 7 días presentan insuficiencia renal aguda (9). Esto justifica la búsqueda de tratamientos para prevenir este efecto colateral.

El mecanismo exacto por el cual la GM induce nefrotoxicidad no se conoce, pero se ha observado que las especies reactivas de oxígeno están involucradas (47).

El ajo, entre otras propiedades, posee actividad antioxidante la cual se ha atribuido a sus compuestos organosulfurados. Recientemente en nuestro laboratorio, se observó que uno de estos compuestos, la SAMC, previno el daño estructural y funcional renal y el aumento en un marcador de estrés oxidativo, el contenido de carbonilos de las proteínas, inducidos por GM (102).

Debido a esto, surgió el interés de investigar si la SAMC también es capaz de prevenir el estrés nitrosativo (medido como inmunohistoquímica de nitrotirosina) y la disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes que se presentan en las ratas con daño renal inducido por GM.

3. HIPÓTESIS

La SAMC será capaz de prevenir el estrés nitrosativo y la disminución de la actividad de algunas enzimas antioxidantes en la nefrotoxicidad inducida por GM.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar si la SAMC previene el aumento del estrés nitrosativo y la disminución de la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Medir en el riñón de ratas control y tratadas con GM, SAMC y GM+SAMC:

- ❖ El estrés nitrosativo por inmunohistoquímica de nitrotirosina.
- ❖ La actividad en corteza renal de las enzimas antioxidantes: catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa total y sus isoformas Mn-SOD y Cu,Zn-SOD.
- ❖ La cantidad en corteza renal de las enzimas antioxidantes catalasa, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD.

5. METODOLOGÍA

5.1 REACTIVOS.

Los siguientes reactivos fueron de J.T. Baker (México, D.F.): fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, sulfato de cobre, EDTA sódico, sulfato de amonio, cloruro de cobre, metanol, cloruro de sodio, xilenos y alcohol etílico. Los siguientes reactivos se compraron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): tritón X-100, Folin & Ciocalteu's phenol, albúmina bovina, NADPH, glutatión reductasa, glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), xantina, nitroazul de tetrazolio (NBT), xantina oxidasa, ácido dietilditiocarbámico (DDC), bolsas para diálisis, leupeptina, pepstatina A, aprotinina, acrilamida, bis acrilamida, trizma base, persulfato de amonio, temed, tween 20, glicina, dodecil sulfato de sodio (SDS), mercaptoetanol, azul de bromofenol, glicerol, Tris-HCl, las placas de autorradiografía X-OMAT AR (XAR 5), revelador y fijador (Twin Pack), acetona, ácido clorhídrico, γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano y hematoxilina. De Mallinckrodt (México, D.F.) fueron el peróxido de hidrógeno y el tartrato de sodio. La azida de sodio fue de Merck (Alemania). Los reactivos de detección para ECL Western Blotting System, membranas de nitrocelulosa Hybond y el papel filtro (blotting paper) fueron de Amersham Pharmacia Biotech (Alemania). Los estándares de peso molecular preteñidos (Low Range) fueron de Bio Rad (California, USA). Las bolsas sellables Kapak fueron de Thomas Scientific (Minnesota, USA). La 3,3-diaminobenzidina fue de Dako. El anticuerpo primario anti-catalasa fue de Calbiochem (California, USA, cat 219010), los anticuerpos primarios anti-Mn-SOD (policlonal de conejo, cat SOD-111) y anti-Cu,Zn-SOD (policlonal de conejo, cat SOD-101) y el anticuerpo secundario anti-conejo (de cabra) fueron de StressGen (British Columbia, Canada, cat SAB-300), el anticuerpo primario anti-nitrotirosina fue de Upstate (Virginia, USA, cat 06-284) y el anticuerpo secundario anti-conejo fue de Amersham (Alemania).

5.2 DETERMINACIONES.

En todas las determinaciones se utilizó la corteza de renal de los grupos de ratas: 1) CT, 2) GM, 3) SAMC y 4) GM+SAMC administrados con los respectivos compuestos previamente en el laboratorio, para preparar los homogeneizados en un homogeneizador tipo politrón con un Generador PTA 7 (Brinkman, cat 027-11-172-6).

Para realizar los cortes a partir de los bloques de parafina se utilizó el microtomo Leica RM 2145.

Para las determinaciones de actividad de las enzimas antioxidantes se utilizaron métodos espectrofotométricos, empleando en todos los casos el espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640 y sus programas protein y kinetics.

Para el Western Blot, se realizó la electroforesis utilizando la cámara de electroforesis Hoefer SE 250 Mighty Small II, el dual gel caster SE 245 y la cámara de transferencia Hoefer TE 22 Mighty Small de Pharmacia Biotech, además de la fuente de poder (Hoefer EPS 2AS200).

5.2.1 Inmunohistoquímica de nitrotirosina (NT)

Se realizaron cortes histológicos de 3 μm en un microtomo para detectar por inmunohistoquímica, la nitrotirosina (NT), un marcador de estrés nitrosativo. Los cortes se depositan sobre portaobjetos esmerilados previamente silanizados (silano al 5% en acetona) y se dejan en el horno a 60°C durante 2 semanas con el fin de eliminar el exceso de parafina y de adherir el tejido al portaobjetos. Posteriormente para desparafinizar se pasan por baños de xilol al 100%, xilol al 100%, xilol-alcohol 1:1 y para hidratar se pasan por alcohol al 100%, alcohol al 96% y agua destilada, 10 minutos cada uno. A continuación se inhibe la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 4.5% en metanol por 1.5 h en oscuridad y se lava con agua. Se bloquea por 30 minutos con albúmina al 3% en PBS pH 7.4 (amortiguador de fosfatos el cual contenía NaH_2PO_4 , 20 mM, Na_2HPO_4 , 80 mM y NaCl 100 mM). Se incuba con el anticuerpo primario anti-nitrotirosina a una dilución 1:700 por 12 horas (toda la noche) en una cámara húmeda. Al siguiente día se lava con PBS y se incuba por 2 horas con el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución 1:700, se lava con PBS y se revela con 50 μL de 3,3-diaminobenzidina 0.025% (DAB) por 15 segundos para después contrastar con hematoxilina (1 g/L) por un minuto y lavar con agua. Se quita el exceso de hematoxilina con alcohol ácido (etanol al 70% - HCl 1%) sumergiendo e inmediatamente lavando con agua; se da un baño de 10 minutos en carbonato de litio (0.1%) donde la hematoxilina vira de morada a azul y se lava con agua. Para deshidratar, se pasa por baños de alcohol al 96%, alcohol al 100%, xilol-alcohol 1:1, xilol al 100% y xilol al 100% por un tiempo de 10 minutos cada uno, se monta en los portaobjetos con resina y se coloca encima un cubreobjetos. Se deja secar la resina y se observa bajo microscopía de luz. Se realiza el análisis cuantitativo con el Zeiss KS 300 Imaging System 3.0,

el valor promedio del control se iguala a la unidad y los resultados se informan como número de veces del CT.

5.2.2 Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal.

En tubos de plástico de 12 x 75 mm colocados en una gradilla dentro de una charola con hielo, se adicionó 1 mL de amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4) 50 mM, pH 7.0 y tritón al 1%, y 100 mg de tejido, para tener una proporción 1:10 p/v. La homogeneización se realizó en el homogeneizador tipo politrón por 10-15 segundos hasta que quedó completamente homogéneo. El homogeneizado se transfirió a tubos cóncavos de 1.5 mL (usando el rotor F241.5 de la centrifuga Microfuga R de Beckman) y se centrifugó a 15,300 rpm a 4°C durante 1 hora, para obtener el sobrenadante al cual se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry *et al.* (103), en este homogeneizado se midieron las actividades de las enzimas antioxidantes CAT, GPx, GR y SOD.

5.2.2.1 Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

La actividad de esta enzima se mide por medio de una reacción cinética de primer orden, en donde, de acuerdo al método de Aebi (104), se registra la disminución en la densidad óptica a 240 nm debida a la descomposición del H_2O_2 que es degradado por la catalasa (Fig. 13).



Fig. 13. Reacción utilizada para medir la actividad de CAT.

El sobrenadante de los homogeneizados de corteza renal se diluyen 1:30 con PBS 10 mM, pH 7.0; de aquí se toman 25 μL y se colocan en una celda de cuarzo, se adicionan 725 μL de H_2O_2 30 mM y se lee la absorbencia a 240 nm a los 0, 15 y 30 segundos. La actividad se determina usando la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual es definida de acuerdo a la siguiente fórmula:

$k = (1/t)(\ln[A_1/A_2])$, donde t es el 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 se obtiene la actividad específica al dividir el valor de k entre los mg de proteína adicionados al ensayo. La actividad de la catalasa se expresa como k/mg de proteína.

5.2.2.2 Glutatión peroxidasa (cGPx) (EC 1.11.1.19)

La actividad de esta enzima se mide indirectamente mediante una reacción acoplada a la glutatión reductasa (GR), donde la GPx al reducir H_2O_2 consume glutatión reducido (GSH) generando glutatión oxidado (GSSG), el cual es regenerado por la GR en presencia del cofactor NADPH (Fig. 14). De este modo, se observa la disminución de la absorbencia del NADPH a 340 nm (105).

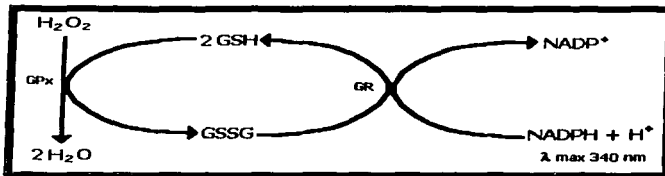


Fig. 14. Reacción utilizada para medir la actividad de GPx.

Los homogeneizados de corteza renal se diluyen 1:10 PBS 50 mM, pH 7.0. Se prepara la mezcla de reacción con EDTA sódico 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, glutatión reducido 1 mM, glutatión reductasa 1 U/mL y se mantiene en hielo durante toda la determinación. En un tubo se mezclan 800 μL de la mezcla de reacción y 100 μL de la muestra diluida, se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos, cumplido este tiempo se adicionan 100 μL de H_2O_2 0.25 mM, se agita y se vacía a una celda de cuarzo, donde se lee la absorbencia a 340 nm durante 3 minutos a intervalos de 1 minuto. Se utiliza como control un blanco que carece de muestra, el cual se resta a cada valor obtenido. La actividad se determina promediando los cambios de absorbencia por minuto y sustituyendo este valor en la ecuación de la Ley de Lambert y Beer: $A = c \times \epsilon \times l$, donde ϵ = coeficiente de absorción milimolar del NADPH a 340 nm ($6.22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), dividiendo el resultado entre los mg de proteína adicionados al ensayo. Así se obtiene la actividad específica expresada en U/mg de proteína, donde 1 U equivale a la cantidad de enzima que consume 1 μmol de NADPH oxidado por minuto.

5.2.2.3 Glutatión reductasa (GR) (EC 1.6.4.2)

La actividad de esta enzima se determina por medio de una reacción en la cual la enzima presente en la muestra convierte el glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH como cofactor, de tal modo que se registra la disminución de la absorbencia del NADPH a 340 nm (Fig. 15) (106).

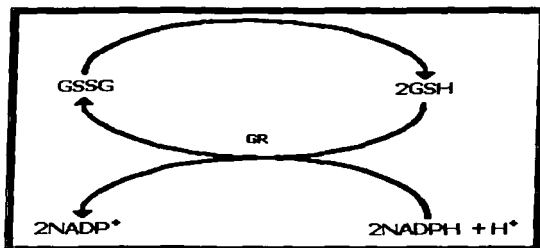


Fig. 15. Reacción utilizada para medir la actividad de GR.

En un tubo se colocan 950 μ L de la mezcla de reacción con PBS 100 mM, pH 7.6, EDTA sódico 0.5 mM, GSSG 1.25 mM y NADPH 0.1 mM, y se mezcla con 50 μ L del homogeneizado previamente diluido 1:5 con PBS 100 mM, pH 7.6. Esta mezcla se coloca en una celda de cuarzo y se mide la absorbencia a 340 nm durante 3 minutos a intervalos de 1 minuto, utilizando como blanco PBS 100 mM, pH 7.6. Los resultados se expresan en U/mg de proteína, en donde 1 U = la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto.

5.2.2.4 Superóxido dismutasa (SOD total, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD) (EC 1.15.1.1)

El fundamento para medir la actividad de esta enzima se basa en la competición de la SOD con el nitroazul de tetrazolio (NBT) por los iones superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. Debido a que el NBT es reducido al interaccionar con los iones superóxido, formando un compuesto colorido (formazán) que absorbe a 560 nm (Fig.16) (107), la actividad de la SOD es directamente proporcional al grado de inhibición del NBT. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la reducción del NBT.

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

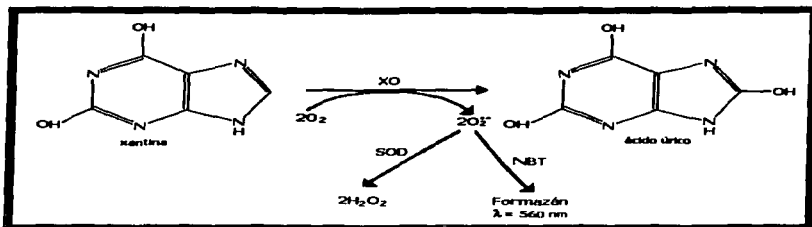


Fig.16. Reacción utilizada para medir la actividad de SOD.

La superóxido dismutasa total se determina colocando en 3 tubos 815 μL de una mezcla de reacción que contiene xantina 0.3 mM, EDTA sódico 0.6 mM, NBT 150 mM, Na_2CO_3 400 mM y albúmina bovina 0.1%. Se incuban los tubos durante 16 minutos a 27°C, iniciando las reacciones al adicionar 165 μL del homogeneizado de corteza renal diluido 1:100 con PBS 50 mM, pH 7.0, más 33 μL de xantina oxidasa 168 U/L a dos de los tubos a intervalos de 15 segundos entre cada tubo agitando con vórtex; al otro tubo se le adiciona 165 μL de la muestra más 33 μL de PBS 50 mM, pH 7.0 en lugar de la xantina oxidasa sirviendo como blanco de la muestra. Una vez cumplidos los 16 minutos, se detienen las reacciones a intervalos de 15 segundos con 330 μL de CuCl_2 0.8 mM y se agita con vórtex. Además se incluyen dos tubos de 100% de reducción de NBT (comparación), los cuales carecen de muestra. Finalmente, se lee a 560 nm el NBT reducido calibrando con la mezcla de reacción y la actividad de SOD total se determina considerando los mg de proteína adicionados al ensayo, de modo que los resultados se expresan como U/mg de proteína.

Para determinar la actividad de la isoforma Mn-SOD, se coloca en tubos una mezcla del homogeneizado diluido 1:2 con ácido dietiltiociarbámico (DDC) 50 mM para inactivar la isoforma Cu,Zn-SOD (108) y se incuba 1 hora a 30°C. Posteriormente las muestras inactivadas se dializan durante 3 horas con PBS 5mM, pH 7.8 – EDTA 0.1 mM. Una vez acabada la diálisis las muestras se diluyen 1:40 con PBS 50 mM, pH 7.0 y se sigue el mismo procedimiento antes descrito para la SOD total.

La actividad de Cu,Zn-SOD se determina mediante la diferencia entre la SOD total y la Mn-SOD.

5.2.3 Western blot de las enzimas antioxidantes.

Se tomaron 100 mg de corteza de cada riñón y se homogeneizaron en 350 μ L de PBS 50 mM, pH 7.4 que contenía EDTA sódico 1 mM e inhibidores de proteasas (leupeptina 5 μ g/mL, pepstatina A 7 μ g/mL y aprotinina 5 μ g/mL) y tritón al 0.1% (109), utilizando el homogeneizador tipo politrón como ya se describió. El homogeneizado se transfirió a tubos cóncavos de 1.5 mL y (usando el rotor JA 18.1 de la centrífuga J2-21 de Beckman) se centrifugó a 3,500 rpm a 4°C durante 15 minutos, para obtener el sobrenadante al cual se le midió la concentración de proteínas por el método de Lowry *et al.* (103) y se ajustó a una concentración de 5 μ g/ μ L para la técnica de western blot de las enzimas antioxidantes CAT y las isoformas de SOD (Mn-SOD y Cu,Zn-SOD).

5.2.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

Se amaran dos moldes para los geles en el dual caster como lo indica el fabricante (110). Se realiza la mezcla para el gel separador al 15% en el siguiente orden: H₂O destilada, acrilamida 30%, Tris 1.5 M, pH 8.8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, persulfato de amonio 10% y TEMED, se vacía en los moldes y se deja polimerizar. Posteriormente se hace lo mismo para el gel concentrador al 5%, cambiando sólo el Tris por Tris 0.5 M, pH 6.8 (111), colocando un peine de 10 pozos. Una vez que los geles polimerizan, se colocan los moldes en la cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis pH 8.3 el cual contiene Tris base 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%.

Las muestras se preparan en tubos cóncavos de 1.5 mL colocando 20 μ g de proteína con solución desnaturalizante (108) que contiene Tris-HCl, 50 mM, pH 6.8, mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1% y glicerol 10%, en una relación 1:1; esta mezcla se coloca en baño maría por 1.5 minutos y se colocan en los pozos, cargando además marcadores de peso molecular. La cámara se conecta a la fuente de poder y se corre a 100 V por 2.5 horas (110).

5.2.3.2 Transferencia

Posteriormente entre dos papeles filtro, los geles se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (112) en la cámara de transferencia (113) con amortiguador de transferencia pH 8.3 el cual contiene metanol 20%, Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%, y se corre a 50 mA por 1 hora. Las membranas se guardan en refrigeración (4°C) hasta su uso.

5.2.3.3 Western blot (W.B.)

Para el Western blot (114), las membranas se bloquean 70 minutos en agitación suave a temperatura ambiente, con leche descremada en polvo al 5% en amortiguador de fosfatotween 20 al 0.1% (PBS-T) pH 7.5 (donde el PBS contiene NaH_2PO_4 , 20 mM, Na_2HPO_4 , 80 mM y NaCl 100 mM) y se les dan dos lavados de 10 minutos con PBS-T. A continuación se incuban con el respectivo anticuerpo primario 70 minutos y se dan dos lavados de 10 minutos con PBS-T. Con el anticuerpo secundario se sigue el mismo procedimiento. Los anticuerpos se diluyen en PBS-T y las incubaciones se hacen en bolsas sellables en agitación suave y constante a temperatura ambiente.

Se revela en un cuarto oscuro (con luz roja), donde se cubren las membranas con el reactivo de detección para ECL (1 mL por membrana) por 2 minutos y se desecha, se coloca la placa de autorradiografía sobre ellas dentro de un casete de exposición, dejando exponer la placa durante 20 minutos. Después se pasa la placa por una charola con revelador y con agitación suave el tiempo necesario para ver la señal, es decir, bandas nítidas; una vez encontrada la señal, se pasa la placa por una charola con fijador y con agitación suave se mantiene ahí por 3 minutos, se lava con agua corriente y se deja secar para realizar la densitometría con el programa Sigma Scan.

Para las tres enzimas se siguió el mismo procedimiento antes descrito, empleando los anticuerpos correspondientes. Los resultados se expresaron como cantidades arbitrarias de densitometría.

5.2.3.3.1 CAT

Para esta enzima se utilizó el anticuerpo primario anti-cátalasa a una dilución 1:500, el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución 1:5000.

5.2.3.3.2 Mn-SOD

Se utilizó el anticuerpo primario anti-Mn-SOD a una dilución 1:7000, y el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución 1:5000.

5.2.3.3.3 Cu,Zn-SOD

Se utilizó el anticuerpo primario anti-Cu,Zn-SOD a una dilución 1:7000, y el anticuerpo secundario anti-conejo a una dilución 1:5000.

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

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. Los resultados se reportaron como la media \pm el error estándar, considerando las diferencias estadísticamente significativas a valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Inmunohistoquímica de NT

La inmunohistoquímica (IHQ) de nitrotirosina (NT) se muestra en la Fig. 17. La tinción aumentó significativamente en el grupo tratado con GM (1.76 ± 0.005) con respecto al grupo CT (1.00 ± 0.004) y el grupo con SAMC (1.00 ± 0.004) no cambió. El grupo GM+SAMC (1.13 ± 0.004) fue diferente del CT pero también del grupo con GM, por lo que la SAMC previno parcialmente el incremento de NT (Fig. 18).

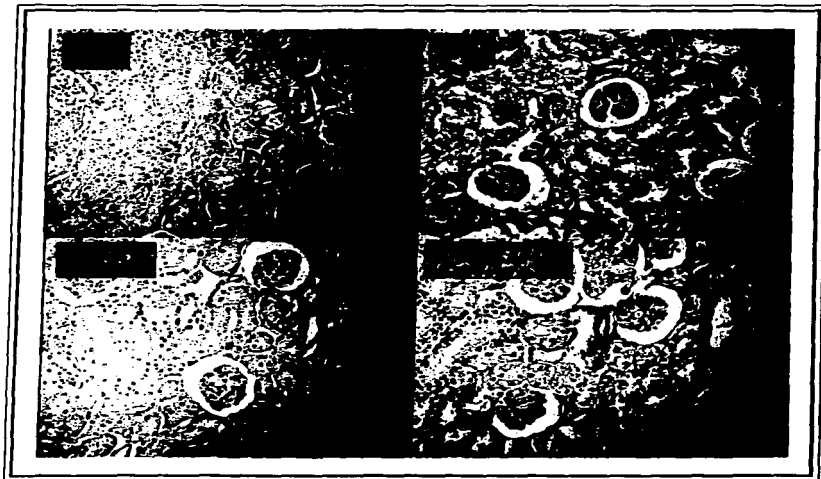


Fig. 17. IHQ de NT.

TRABAJO CON
VENECIA DE ORIGEN

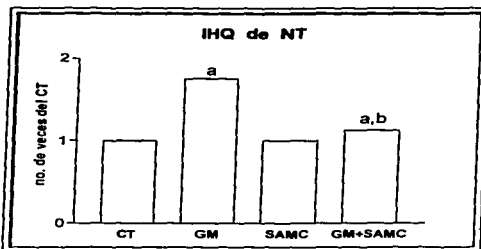


Fig. 18. Efecto de GM y SAMC sobre IHQ de NT; n=3 ratas; a= $p<0.001$ vs. CT, b= $p<0.001$ vs. GM.

6.2 Actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal

6.2.1 Actividad de CAT

La GM disminuyó significativamente la actividad de CAT (0.29 ± 0.03 vs. 0.55 ± 0.04 en el control). La SAMC por sí misma disminuyó la actividad de CAT a 0.35 ± 0.01 , motivo por el cual, cuando se administró a las ratas tratadas con GM, no se previno la disminución en la actividad de la enzima (0.26 ± 0.03) (Fig. 19).

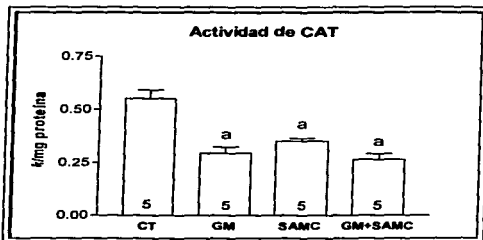


Fig. 19. Efecto de GM y SAMC sobre la actividad de CAT; a= $p<0.01$ vs. CT.

6.2.2 Actividad de cGPx

La actividad de cGPx disminuyó significativamente en el grupo tratado con GM (0.09 ± 0.007) con respecto al grupo CT (0.16 ± 0.007). La SAMC, administrada a las ratas tratadas con GM (0.12 ± 0.007) previno parcialmente esta disminución (Fig. 20).

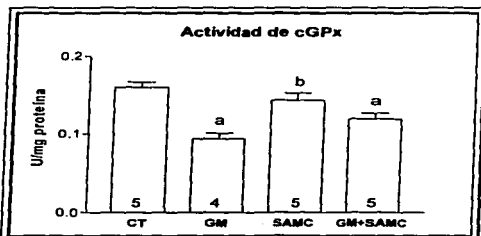


Fig. 20. Efecto de GM y SAMC sobre la actividad de cGPx; a= $p < 0.01$ vs. CT, b= $p < 0.01$ vs. GM.

6.2.3 Actividad de GR

Se observó una disminución significativa en el grupo tratado con GM (0.03 ± 0.002) comparado con el grupo CT (0.037 ± 0.002). La SAMC administrada en el grupo tratado con GM (0.041 ± 0.0007) previno totalmente la disminución en la actividad de la enzima (Fig. 21).

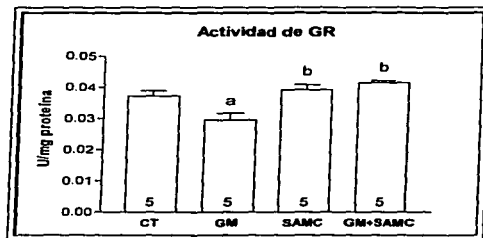


Fig. 21. Efecto de GM y SAMC sobre la actividad de GR; a= $p < 0.05$ vs. CT, b= $p < 0.01$ vs. GM.

6.2.4 Actividad de SOD total

En este caso, a diferencia de las otras enzimas, en el grupo tratado con GM (33 ± 1.4) no hubo diferencia significativa comparado con el control (34 ± 3.1); en el caso de SAMC (32 ± 1.3) y el tratamiento de GM+SAMC (35 ± 2.8) tampoco mostraron diferencias. De este modo, la actividad de la SOD total no se afectó por ninguno de los tratamientos (Fig. 22).

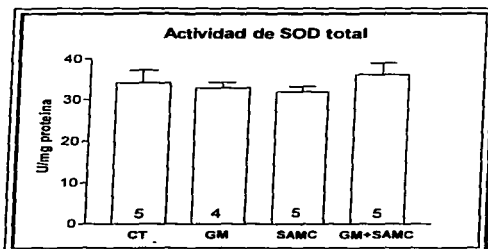


Fig. 22. Efecto de GM y SAMC sobre la actividad de SOD total.

6.2.5 Actividad de Mn-SOD

La actividad de Mn-SOD mostró una tendencia a disminuir en el grupo tratado con GM (4.6 ± 0.7) comparado con el CT (7.4 ± 0.4); mientras que el grupo con SAMC (7.8 ± 1.2) y el grupo tratado con GM+SAMC (7.9 ± 1.47) permanecen sin cambios con respecto al control. De tal modo que la SAMC previno la tendencia de la actividad de la enzima a disminuir con GM (Fig. 23).

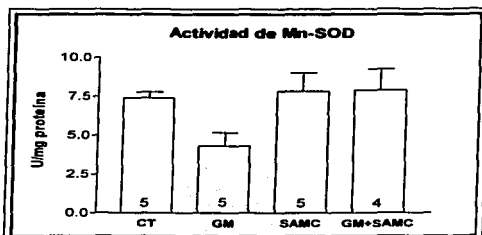


Fig. 23. Efecto de GM y SAMC sobre la actividad de Mn-SOD.

6.2.6 Actividad de Cu,Zn-SOD

Los tratamientos con GM (28 ± 2), SAMC (24 ± 1) y GM+SAMC (29 ± 3), no afectaron la actividad de Cu,Zn-SOD comparados con el grupo CT (27 ± 3) (Fig. 24).

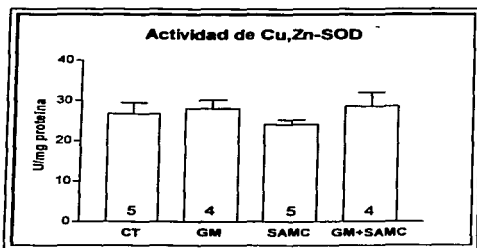


Fig. 24. Efecto de GM y SAMC sobre la actividad de Cu,Zn-SOD.

6.3 Western blot de las enzimas antioxidantes en corteza renal

6.3.1 W.B. de CAT

En la Fig. 25 se muestra el contenido de la CAT medido por western blot. La cantidad de esta enzima tiende a disminuir en el grupo tratado con GM (166 ± 21) con respecto al CT

TESIS CON
FALLA EN EL GRUPO

(248±32). La SAMC (110±17) *per se* disminuyó la cantidad de la enzima, por lo que en el grupo GM+SAMC (131±15) también se observa una disminución significativa (Fig. 26).



CT GM SAMC GM+SAMC

Fig. 25. Western blot de CAT.

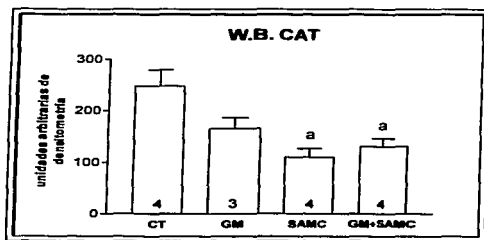
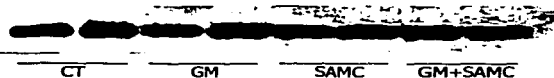


Fig. 26. Efecto de GM y SAMC sobre la cantidad de CAT; a= $p<0.05$ vs. CT.

6.3.2 W.B.de Mn-SOD

El contenido de la isoforma Mn-SOD, determinado por western blot, se muestra en la Fig. 27. La cantidad de esta enzima en los grupos tratados con GM (214±27), SAMC (252±10) y GM+SAMC (227±8), no muestran diferencias significativas al compararlos con el CT (232±20) (Fig. 28).



CT GM SAMC GM+SAMC

Fig. 27. Western blot de Mn-SOD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

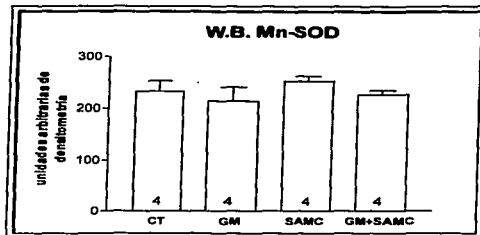


Fig. 28. Efecto de GM y SAMC en la cantidad de Mn-SOD.

6.3.3 W.B. de Cu,Zn-SOD

La cantidad de la isoforma Cu,Zn-SOD es mostrada en la Fig. 29. El contenido de Cu,Zn-SOD no se afecta por GM (336 ± 39), SAMC (342 ± 5) o GM+SAMC (368 ± 7) al compararlos con el CT (289 ± 27) (Fig. 30).

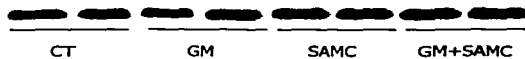


Fig. 29. Western blot de Cu,Zn.SOD.

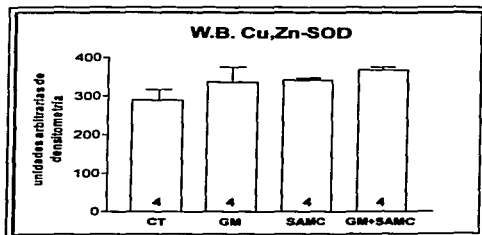


Fig. 30. Efecto de GM y SAMC sobre la cantidad de Cu,Zn-SOD.

7. DISCUSIÓN

La gentamicina (GM) es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de los aminoglucósidos y es muy usado para el tratamiento de infecciones por bacterias gram negativas (5). Sin embargo, su uso se ha limitado debido a que uno de los efectos colaterales que presenta es la nefrotoxicidad; de hecho, se ha reportado que aproximadamente 10-15% de los pacientes tratados con GM por más de 7 días presentan insuficiencia renal aguda (9), la cual se caracteriza por una disminución abrupta en la velocidad de filtración glomerular, resultando en la acumulación de productos finales del metabolismo tales como urea y creatinina (3). Aunque el mecanismo de esta nefrotoxicidad no es aun bien conocido, hay evidencias tanto *in vivo* como *in vitro*, en donde se muestra que la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot OH$, están implicadas en el daño provocado por la GM (47), observándose que la administración de antioxidantes y atrapadores de EROs, entre los que se encuentran los compuestos organosulfurados del ajo, pueden prevenir dicho daño (49,50,56-59). Con respecto a esto último, se ha observado que una dieta enriquecida con polvo de ajo al 2% y el extracto de ajo envejecido, protegen contra la insuficiencia renal aguda ocasionada por GM y previenen el incremento de lipoperoxidación renal (58) y de carbonilos (115), respectivamente, lo que ha llevado a buscar los compuestos responsables de dicho efecto.

Recientemente en nuestro laboratorio se realizó un protocolo con cuatro grupos de ratas: 1) control (CT), 2) GM, 3) S-alilmercaptocisteína (SAMC) y 4) GM+SAMC, que se administraron con los respectivos compuestos. Este protocolo mostró que la SAMC es capaz de prevenir parcialmente el daño renal funcional y estructural causado en la nefrotoxicidad inducida por GM en ratas. Basados en dichos resultados, en este trabajo se investigó si la SAMC es capaz de modular la actividad de enzimas antioxidantes y de prevenir el aumento en el contenido de nitrotirosina en riñón. Esta información nos permitirá saber si el efecto protector de SAMC en la nefrotoxicidad por gentamicina está mediado, al menos en parte, por la disminución de la nitración de proteínas (estrés nitrosativo) y/o de la inducción de enzimas antioxidantes.

La SAMC es uno de los componentes principales del extracto de ajo envejecido, que se obtiene por extracción etanólica, y se encuentra presente a una concentración de 1.9 mg/g en su apariencia en polvo (89). Hay evidencias de que el EAE y sus constituyentes, principalmente SAC y SAMC, tienen propiedades antioxidantes debido a su capacidad para atrapar EROs e inhibir la formación de lipoperóxidos y la oxidación de las LDL, así como de prevenir la

disminución de glutatión (91-96), y particularmente, en nuestro laboratorio se han podido observar estas propiedades protectoras en la nefrotoxicidad inducida por GM (102,115,116).

Se sabe que el incremento en los niveles de EROs induce citotoxicidad debido a la acción concertada entre radicales derivados del oxígeno (117) y del nitrógeno (14). En este trabajo se utilizó la nitrotirosina (NT) como marcador de estrés nitrosativo. Como ya se había demostrado en estudios previos, la administración de GM produjo un incremento de NT (nitración del aminoácido tirosina presente en las proteínas) en corteza renal, lo cual indica la presencia de EROs, ya que, para que haya una nitración de proteínas, se necesita la presencia de agentes nitrosantes, los cuales se originan del peroxinitrito (ONOO⁻, un agente altamente oxidante y tóxico) y este, es formado a partir de la interacción de dos radicales libres, el ion superóxido (O₂⁻) y el óxido nítrico (NO[•]) (70). Esto es importante, ya que la nitración de proteínas afecta su función normal o el propio peroxinitrito puede afectar además lípidos y ADN, conduciendo a un desbalance en el metabolismo de la célula y causando eventualmente su muerte. En este sentido, se encontró que el efecto protector de la SAMC está asociado a la prevención del incremento de estrés nitrosativo, probablemente debido a su habilidad de prevenir la disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes (ver más adelante) y a su propiedad antioxidante, pudiendo probablemente atrapar O₂⁻, ya que al disminuir este, disminuyen también los niveles de peroxinitrito. Esto concuerda con lo que se ya se ha visto anteriormente en el laboratorio, ya que otros compuestos del ajo como dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS) y el propio extracto de ajo envejecido (EAE) (siendo la SAMC uno de sus componentes), han prevenido también el incremento de NT (59, 115, 118).

Se ha observado que la GM afecta al sistema antioxidante enzimático ya que disminuye la actividad y cantidad de la enzima catalasa (CAT), disminuye la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), y no afecta a la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD), además, que la administración de compuestos de ajo previenen la disminución de la actividad de Mn-SOD, GPx y GR (4,58,59,115). En este trabajo también se determinó la actividad y cantidad de estas enzimas antioxidantes y se encontró que el comportamiento fue similar más no idéntico. La GM disminuyó la actividad de la CAT, lo cual puede ser secundario a la disminución de su cantidad y de su ARNm (58), ya que, aunque en este caso la disminución en la cantidad no alcanzó a ser estadísticamente significativa, muestra una clara tendencia a disminuir. La GM también disminuyó la actividad de cGPx y de GR, la actividad de Mn-SOD

mostró una clara tendencia a disminuir independientemente de su cantidad, mientras que la actividad o cantidad de CuZn-SOD no cambió. Esto se puede explicar en parte, por el hecho de que el peroxinitrito daña la Mn-SOD (119) y la GPx (120) y el O_2^- inactiva a la GPx (121) y a la CAT (122), además, por el hecho de que la Mn-SOD es más lábil que la Cu,Zn-SOD (58). Es importante hacer notar que la SAMC *per se*, no induce a las enzimas antioxidantes, pero se observó que en el grupo tratado con GM+SAMC, el efecto protector de la SAMC también está asociado a la prevención total de la disminución de la actividad de la GR y a la prevención parcial en la disminución de la actividad de cGPx, además de la tendencia que muestra la Mn-SOD. Pero en el caso de la CAT, no logra prevenir la disminución de su actividad y cantidad, explicándose por el hecho de que no sólo decrece la actividad de la enzima, sino también su cantidad y el contenido de ARNm (58); de hecho, la SAMC por sí misma disminuye su actividad. Este efecto ya se había notado con el ajo en polvo y con otros compuestos derivados del ajo, como es el caso del DADS (59) y el DAS (118). Aunque no está completamente claro el mecanismo por el cual ocurre esta disminución, se ha encontrado que la síntesis de CAT disminuye en ratas alimentadas con polvo de ajo al 2% (123). Es muy interesante notar que ni el EAE (115) ni la SAC (116) producen esta disminución.

Otra posible explicación del efecto protector de la SAMC, podría ser que tuviera la capacidad para quelar metales, lo que ha sido observado con el EAE (96); dado que los metales de transición están involucrados en la formación de EROs mediante la reacción de Haber-Weiss (67), si la SAMC tiene la capacidad de inactivar estos metales quelándolos, entonces ya no incrementarían la producción de EROs, tales como el $\cdot OH$. Una explicación más para los efectos observados en este trabajo, es que la SAMC incrementa el contenido de glutatión, ya que esto se ha observado en estudios de SAMC con hepatotóxicos y en otros con EAE (100, 124). Es muy probable que la SAMC sea capaz de incrementar el contenido de glutatión en la nefrototoxicidad debida a GM, debido a que la SAMC logra prevenir la disminución en la actividad de GR, ocasionada por GM, y esta enzima es la que recicla el GSSG (glutatión oxidado) pasándolo a GSH (glutatión reducido). Si el GSH aumenta con SAMC, se esperaría en el grupo GM+SAMC que la GPx pueda disponer de su sustrato y llevar a cabo la conversión de peróxidos (como el H_2O_2) a agua, como consecuencia ya no se incrementarían los niveles de estas especies implicadas en el daño. Además la SAMC previno parcialmente la disminución en la actividad de GPx lo cual también contribuiría a la degradación de los peróxidos

8. CONCLUSIÓN

Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que el efecto protector que muestra la SAMC en la nefrotoxicidad inducida por GM está asociado a la atenuación del estrés nitrosativo y a la prevención de la disminución de algunas enzimas antioxidantes. De tal modo que la SAMC es uno de los compuestos del extracto de ajo envejecido que contribuyen a explicar su efecto protector.

REFERENCIAS

1. Tisher CC, Madsen KM: Anatomy of the kidney; en Brenner BM (ed). The Kidney. Saunders Company. Philadelphia,2000;pp. 3-67.
2. Guyton AC. Tratado de fisiología médica. Interamericana McGraw-Hill. México,1992;pp. 296-300.
3. Brady HR, Brenner BM, Clarkson MR, Lieberthal W: Acute renal failure; en Brenner BM (ed). The kidney. Saunders Company. Philadelphia,2000;pp 1201-62.
4. Pérez García V. Efecto del dialil trisulfuro en la insuficiencia renal aguda experimental. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM 2002.
5. Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. Gen Pharmacol 1995;26:1477-87.
6. Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, Willnow TE. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. J Biol Chem 2002;277:618-22.
7. Chambers HF, Sande MA. Aminoglucósidos; en Hardman JG, Limbid LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (eds). Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill Interamericana. México,1996;pp 1173-86.
8. Laurent G, Kishore BK, Tulken PM. Aminoglycoside nephrotoxicity: Cellular and molecular aspects. Pharmacol 1987;1:40-4.
9. Lerner SA, Schmitt BA, Seligsohn R, Matz GJ. Comparative study of ototoxicity and nephrotoxicity in patients randomly assigned to treatment with amikacin or gentamicin. Am J Med 1986;80:98-104.
10. Kahlmeter G, Dahlager JI. Aminoglycoside toxicity: a review of clinical studies published between 1975 and 1982. J Antimicrob Chemother 1984;13:9-22.
11. Mathew TH. Drug-induced renal disease. Med J Aust 1992;156:724-8
12. Henry SA, Bendush CB. Aztreonam: worldwide overview of the treatment of patients with gram-negative infections. Am J Med 1985;78:57-64.
13. Hou SH, Bushinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT. Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. Am J Med 1983;74:243-8.
14. Mazzoni E, Britti D, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. Eur J Pharmacol 2001;424:75-83.
15. Can C, Sen S, Boztok N, Tuglular I. Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. Eur J Pharmacol 2000;390:327-34.
16. Cunha MA, Schor N. Effects of gentamicin, lipopolysaccharide, and contrast media on immortalized proximal tubular cells. Ren Fail 2002;24:687-90.
17. Porter GA, Bennett WM. Nephrotoxic acute renal failure due to common drugs. Am J Physiol 1981;241:F1-8.
18. Humes HD, Weinberg JM: Toxic nephropathies; en Brenner BM, Rector FC (eds). The Kidney. Saunders Co Philadelphia,1986;pp 1491-532.
19. Silverblatt FJ, Kuehn C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. Kidney Int 1979;15:335-45.
20. Pastoriza-Munoz E, Bowman RL, Kaloyanides GJ. Renal tubular transport of gentamicin in the rat. Kidney Int 1979;16:440-50.
21. Sastrasinh M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD. Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. J Pharmacol Exp Ther 1982;222:350-8.

22. Williams PD, Hottendorf GH, Bennett DB. Inhibition of renal membrane binding and nephrotoxicity of aminoglycosides. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;237:919-25.
23. Molitoris BA. Cell biology of aminoglycoside nephrotoxicity: newer aspects. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997;6:384-8.
24. Sundin DP, Meyer C, Dahl R, Geerdes A, Sandoval R, Molitoris BA. Cellular mechanism of aminoglycoside tolerance in long-term gentamicin treatment. *Am J Physiol* 1997;272:C1309-18.
25. Feldman S, Wang MY, Kaloyanides GJ. Aminoglycosides induce a phospholipidosis in the renal cortex of the rat: an early manifestation of nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;220:514-20.
26. Laurent G, Carlier MB, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P. Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem Pharmacol* 1982;31:3861-70.
27. Moestrup SK, Cui S, Vorum H, Bregengard C, Bjorn SE, Gliemann J, Christensen EI. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalín mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest* 1995;96:1404-13.
28. Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalín/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 1996;271:F900-7.
29. Christensen EI, Nielsen S, Moestrup SK, Borre C, Maunsbach AB, de Heer E, Ronco P, Hammond TG, Verroust P. Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Eur J Cell Biol* 1995;66:349-64.
30. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalín," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9725-9.
31. Moriyama T, Nakahama H, Fukuhara Y, Horio M, Yanase M, Orita Y, Kamada T, Kanashiro M, Miyake Y. Decrease in the fluidity of brush-border membrane vesicles induced by gentamicin. A spin-labelling study. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1169-74.
32. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2383-92.
33. Kosek JC, Mazze RJ, Cousins MJ. Nephrotoxicity of gentamicin. *Lab Invest* 1974;30:48-57.
34. Houghton DC, Hartnett M, Campbell-Boswell M, Porter G, Bennett W. A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Pathol* 1976;82:589-612.
35. Luft FC, Patel V, Yum MN, Patel B, Kleit SA. Experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J Lab Clin Med* 1975;86:213-20.
36. Fabre J, Rudhardt M, Blanchard P, Regamey C. Persistence of sisomicin and gentamicin in renal cortex and medulla compared with other organs and serum of rats. *Kidney Int* 1976;10:444-9.
37. Sundin DP, Sandoval R, Molitoris BA. Gentamicin inhibits renal protein and phospholipid metabolism in rats: implications involving intracellular trafficking. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:114-23.
38. Ramsammy LS, Josepovitz C, Kaloyanides GJ. Gentamicin inhibits agonist stimulation of the phosphatidylinositol cascade in primary cultures of rabbit proximal tubular cells and in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;247:989-96.
39. Lipsky JJ, Lietman PS. Neomycin inhibition of adenosine triphosphatase: evidence for a neomycin-phospholipid interaction. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;18:532-5.
40. Yang CL, Du XH, Zhao JH, Chen W, Han YX. Zinc-induced metallothionein synthesis could protect from gentamicin nephrotoxicity in suspended proximal tubules of rats. *Ren Fail* 1994;16:61-9.

41. Powell JH, Reidenberg MM. In vitro response of rat and human kidney lysosomes to aminoglycosides. *Biochem Pharmacol* 1982;31:3447-53.
42. Buss WC, Piatt MK. Gentamicin administered in vivo reduces protein synthesis in microsomes subsequently isolated from rat kidneys but not from rat brains. *J Antimicrob Chemother* 1985;15:715-21.
43. Bennett WM, Mela-Riker LM, Houghton DC, Gilbert DN, Buss WC. Microsomal protein synthesis inhibition: an early manifestation of gentamicin nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1988;255:F265-9.
44. Wilhelm JM, Jessop JJ, Pettitt SE. Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: stimulation of errors in the translation of natural messengers in extracts of cultured human cells. *Biochemistry* 1978;17:1149-53.
45. Weinberg JM, Harding PG, Humes HD. Mechanisms of gentamicin-induced dysfunction of renal cortical mitochondria. Effects on mitochondrial monovalent cation transport. *Arch Biochem Biophys* 1980;205:232-9.
46. Kaloyanides GJ. Drug-phospholipid interactions: role in aminoglycoside nephrotoxicity. *Ren Fail* 1992;14:351-7.
47. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997;29:465-77.
48. Walker PD, Shah SV. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 1987;253:C495-9.
49. Yang CL, Du XH, Han YX. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* 1995;17:21-6.
50. Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1988;81:334-41.
51. Ramsammy LS, Josepovitz C, Ling KY, Lane BP, Kaloyanides GJ. Effects of diphenylphenylenediamine on gentamicin-induced lipid peroxidation and toxicity in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;238:83-8.
52. Fauconneau B, Tallineau C, Huguët F, Piriou A. Gentamicin-induced kidney damage and lipid peroxidation in rats. *Toxicol Lett* 1995;76:127-34.
53. Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Hernandez-Pando R. Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis. *Mol Cell Biochem* 2000;211:69-77.
54. Ueda N, Guidet B, Shah SV. Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 1993;265:F435-9.
55. Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1749-52.
56. Ademuyiwa O, Ngaha EO, Ubah FO. Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 1990;9:281-8.
57. Nakajima T, Hishida A, Kato A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 1994;266:F425-31.
58. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 2000;29:602-11.
59. Pedraza-Chaverri J, Gonzalez-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R. Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;473:71-8.
60. Beteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000;49:3-8.

61. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287-312.
62. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 2003;111:583-93.
63. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:13-8.
64. Winterbourn CC, Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 2000;29:403-9.
65. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999;31:53-9.
66. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987;1:358-64.
67. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
68. Motterlini R, Green CJ, Foresti R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:615-24.
69. Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003;134:281-9.
70. Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 2003;111:583-93.
71. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003;140-141:105-12.
72. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10405-9.
73. Marklund SL; en Packer L (ed). *Superoxide Dismutase. Methods in Enzymology*. Academic Press. San Diego,2002;pp. 23-80.
74. Carlsson LM, Marklund SL, Edlund T. The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5219-22.
75. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248:4793-6.
76. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:4343-7.
77. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989;79:279-88.
78. Bai J, Cederbaum AI. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept* 2001;10:189-99.
79. Prabhu KS, Reddy PV, Gumprich E, Hildenbrandt GR, Scholz RW, Sordillo LM, Reddy CC. Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochem J* 2001;360:345-54.
80. Esworthy RS, Swiderek KM, Ho YS, Chu FF. Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochim Biophys Acta* 1998;1381:213-26.
81. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987;256:677-86.
82. Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994;266:C367-75.

83. Roveri A, Maiorino M, Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1994;233:202-12.
84. Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem* 1990;265:454-61.
85. Behne D, Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr* 2001;21:453-73.
86. Huang J, Philbert MA. Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res* 1995;680:16-22.
87. Ye B, Gitler C, Gressel J. A high-sensitivity, single-gel, polyacrylamide gel electrophoresis method for the quantitative determination of glutathione reductases. *Anal Biochem* 1997;246:159-65.
88. Halliwell B, Gutteridge J: Antioxidant defences. Free radical in biology and medicine. Oxford,2001;pp.105-245.
89. Koch HP, Lawson LD (eds.). Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. Williams & Wilkins. Baltimore,1996;pp37-114.
90. García Alamilla J. La composición química del ajo y sus propiedades antioxidantes. Tesis de Licenciatura, Facultad de química, UNAM 2003.
91. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 2001;131:1010S-5S.
92. Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y. Pharmacologic activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. *J Nutr* 2001;131:1080S-4S.
93. Imal 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;60:417-20.
94. Hikino H, Tohkin M, Kiso Y, Namiki T, Nishimura S, Takeyama K. Antihepatotoxic actions of *Allium sativum* bulbs. *Planta Med* 1986;1:163-8.
95. Nakagawa S, Kasuga S, Matsuura H. Prevention of liver damage by Aged Garlic Extract and its Components in mice. *Phyto Res* 1988;1:1-4.
96. Dillon SA, Burmi RS, Lowe GM, Billington D, Rahman K. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sci* 2003;72:1583-94.
97. Shirin H, Pinto JT, Kawabata Y, Soh JW, Delohery T, Moss SF, Murty V, Rivlin RS, Holt PR, Weinstein IB. Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide. *Cancer Res* 2001;61:725-31.
98. Sigounas G, Hooker J, Anagnostou A, Steiner M. S-allylmercaptocysteine inhibits cell proliferation and reduces the viability of erythroleukemia, breast, and prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer* 1997;27:186-91.
99. Chu TC, Han P, Han G, Potter DE. Intraocular pressure lowering by S-allylmercaptocysteine in rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 1999;15:9-17.
100. Sumioka J, Matsura T, Yamada K. Therapeutic effect of S-allylmercaptocysteine on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;433:177-85.
101. Lau BH. Suppression of LDL oxidation by garlic. *J Nutr* 2001;131:985S-8S.
102. Chirino López YI. Efecto de la S-allylmercaptocisteína en un modelo de daño renal inducido por gentamicina. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM 2003.
103. Lowry OA, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-75.

104. Aebi HE. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
105. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1976;71:952-8.
106. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975;250:5475-80.
107. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 1984;105:457-64.
108. Iqbal J, Whittney P. Use of cyanide and diethylthiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med* 1991;10:69-77.
109. Sohal RS, Agarwal S, Dubeq A, Orr WC. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7255-9.
110. User manual of Hoefer Mighty Small II SE 250 mini-vertical gel electrophoresis unit. Pharmacia Biotech 1997.
111. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Chapter 18, Chris Nolan (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
112. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-3.
113. User manual of Hoefer TE 22 Mighty Small unit. Pharmacia Biotech 1997.
114. User manual of ECL Western Blotting. Amersham Pharmacia Biotech 2000.
115. Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 2003;73:2543-56.
116. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 2003;35:317-24.
117. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;450:67-76.
118. Cerón Toalá AC. Efecto protector del dialil sulfuro sobre la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM 2002.
119. MacMillan-Crow LA, Thompson JA. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1999;366:82-8.
120. Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1998;349:1-6.
121. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985;240:500-8.
122. Rister M, Baehner RL. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest* 1976;58:1174-84.
123. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MD, 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.
124. Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 1999;132:215-25.