

00581



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**EXPRESIÓN Y PAPEL FUNCIONAL  
DE LA HEMO OXIGENASA-1  
EN LA INSUFICIENCIA RENAL  
AGUDA INDUCIDA POR  
DICROMATO DE POTASIO**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A:  
M. en C. DIANA BARRERA OVIEDO

Tutor: Dr. José Pedraza Chaverri



MÉXICO, D. F.

Febrero 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Barrera Oviedo

Diana

FECHA: 28 Enero 2004

FIRMA: 

## EXPRESIÓN Y PAPEL FUNCIONAL DE LA HEMO OXIGENASA-1 EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR DICROMATO DE POTASIO

### RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverrí en el laboratorio de Bioquímica Clínica, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. José Pedraza Chaverrí	Facultad de Química, UNAM
Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología, UNAM
Dr. Armando Tovar Palacio	INCMN

Se reconoce la colaboración del Dr. Rogelio Hernández Pando, del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de histología e inmunohistoquímica.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (40009-M), DGAPA (IN210201) y PAEP-UNAM (203307). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (129718) y DGEP-UNAM (5991701) para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en Febrero de 2004.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Estela Sánchez de Jiménez	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Armando Tovar Palacio	INCMN "Salvador Zubirán"
Vocal	Dr. Gerardo Gamba Ayala	INCMN "Salvador Zubirán"
Vocal	Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Rafael Moreno Sánchez	INC "Ignacio Chávez"
Suplente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Fisiología, UNAM

## ÍNDICE

Resumen	vi
Abstract	vii
Abreviaturas	viii
I. Antecedentes	1
1. Riñón	1
1.1. Nefrona	2
1.2. Corpúsculo renal	3
1.3. Bases morfológicas de la filtración glomerular	5
1.4. Sistema tubular de la nefrona	6
1.4.1. Túbulo proximal	6
1.4.2. Túbulo contorneado proximal	6
1.4.3. Túbulo proximal recto	8
1.4.4. Segmento delgado del asa de Henle	8
1.4.5. Túbulo distal	9
1.4.6. Sistema de túbulos colectores	9
1.5. Insuficiencia renal aguda (IRA)	11
1.5.1. IRA intrínseca	12
1.5.2. Patofisiología de la IRA intrínseca o necrosis tubular aguda (NTA)	13
1.5.2.1. Alteraciones hemodinámicas en la NTA	14
1.5.2.2. Disfunción tubular en la NTA	14
1.5.2.3. Respuesta metabólica al daño	15
1.5.2.3.1. Depleción de ATP	15
1.5.2.3.2. Edema celular	15
1.5.2.3.3. Incremento del calcio intracelular	16
1.5.2.3.4. Activación de fosfolipasas	16
1.5.2.3.5. Activación de proteasas	16
1.5.2.3.6. Activación de endonucleasas	17
1.5.2.3.7. Daño oxidativo (estrés oxidativo)	17
2. Cromo	17
2.1. Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ )	17
3. Estrés oxidativo	18
3.1. Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	19
3.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	20
3.3. Radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )	21
3.4. Singulete de oxígeno ( $^1O_2$ )	22
3.5. Peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ )	22
3.6. Antioxidantes en los sistemas biológicos	23
3.6.1. Sistema antioxidante no enzimático	24
3.6.2. Sistema antioxidante enzimático	25
3.6.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)	25
3.6.2.2. Catalasa (CAT)	26
3.6.2.3. Glutatiión peroxidasa (GPX)	27
3.6.2.4. Glutatiión reductasa (GR)	28
3.6.2.5. Peroxirredoxinas (Prx)	29
3.6.2.6. Hemo oxigenasa (HO)	29
3.6.2.6.1. Isoformas	31

II. Introducción	33
1. IRA y estrés oxidativo	33
2. NTA mediada por $K_2Cr_2O_7$	34
3. EROs en la IRA por $K_2Cr_2O_7$	35
4. Enzimas antioxidantes en la IRA por $K_2Cr_2O_7$	36
5. HO-1 e IRA	36
III. Justificación	40
IV. Hipótesis	40
V. Objetivo general	41
VI. Objetivos particulares	41
VII. Materiales y métodos	42
1. Materiales	42
2. Animales	42
3. Diseño experimental	42
4. Muestras	44
4.1. Orina	44
4.2. Suero	44
4.3. Riñón	44
4.4. Microsomas	44
4.5. Homogenado	44
4.6. Homogenado con inhibidores de proteasas	44
4.7. Cuantificación de proteínas	45
4.8. Cortes histológicos	45
5. Evaluación del daño renal	45
5.1. Daño tubular	45
5.1.1. Actividad de la enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) en la orina	45
5.1.2. Cuantificación de proteínas en la orina	46
5.1.3. Tinción de H&E	46
5.1.4. Análisis histológico	46
5.2. Función glomerular	47
5.2.2. Depuración de creatinina	47
5.2.3. Nitrógeno de la urea en el suero sanguíneo (BUN)	47
6. Evaluación de la expresión de las enzimas antioxidantes en el riñón	48
6.1. Actividad de enzimas	48
6.1.1. Actividad de la hemo oxigenasa (HO)	48
6.1.2. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	48
6.1.2.1. SOD total	48
6.1.2.2. SOD de manganeso (Mn-SOD)	49
6.1.2.3. SDO de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD)	49
6.1.3. Actividad de la catalasa (CAT)	49
6.1.4. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)	50
6.1.5. Actividad de la glutatión reductasa (GR)	50
6.2. Cantidad de enzimas	50
6.2.1. Inmunoensayo tipo "western blot"	50
6.2.2. Inmunohistoquímica de HO-1	51
7. Evaluación del estrés oxidativo	51
7.1. Contenido de carbonilos en proteínas	51
7.2. Inmuhistoquímica de nitrotirosina	52

8. Análisis estadístico	52
VIII. Resultados	53
1. Curso temporal de la IRA producida por $K_2Cr_2O_7$	53
1.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario	53
1.2. Función tubular	54
1.3. Función glomerular	54
1.4. Expresión de HO	57
2. Efecto protector del cloruro de estaño ( $SnCl_2$ ) en la IRA por $K_2Cr_2O_7$	57
2.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario	57
2.2. Expresión de hemo oxigenasa 1	57
2.3. Función tubular	59
2.3.1. Estructura tubular	62
2.4. Función glomerular	64
2.5. Otras enzimas antioxidantes	65
2.6. Estrés oxidativo	67
3. Importancia de la HO-1 en la protección del $SnCl_2$ en la IRA por $K_2Cr_2O_7$	68
3.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario	68
3.2. Expresión de HO	68
3.3. Función tubular	70
3.3.1. Estructura tubular	70
3.4. Función glomerular	74
3.5. Estrés oxidativo	76
4. Efecto del $SnCl_2$ administrado al mismo tiempo o 12 h después que el $K_2Cr_2O_7$	78
4.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario	78
4.2. Expresión de HO-1	78
4.3. Función tubular	81
4.3.1. Estructura tubular	82
4.4. Función glomerular	82
4.5. Estrés oxidativo	82
IX. Resumen de resultados	85
X. Discusión	86
XI. Conclusiones	90
XII. Perspectivas	90
XIII. Referencias	92

## RESUMEN

La hemo oxigenasa (HO) es la enzima que cataliza la reacción limitante en la degradación del grupo hemo. Se ha observado que su isoforma inducible, HO-1, protege contra algunos tipos de daño agudo como la insuficiencia renal aguda (IRA). En este trabajo se evaluó: (a) la expresión y el papel funcional de la HO-1 en la IRA inducida por dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), (b) si el efecto protector del cloruro de estaño ( $SnCl_2$ ) (administrado 12 h antes del  $K_2Cr_2O_7$ ) está asociado con el aumento de HO-1, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), y catalasa (CAT), y (c) si la inducción previa de la HO-1 es indispensable. Se observó la presencia de la HO-1 en células epiteliales de túbulo renal, desde las 2 h hasta las 24 h, con un máximo de expresión a las 6 h en ratas tratadas con  $K_2Cr_2O_7$ . Se determinó estudiar la IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$  a las 24 y 48 h, se observó daño renal (funcional y estructural) y presencia de estrés oxidativo (aumento del contenido de nitrotirosina y de carbonilos). La actividad de las enzimas Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, y GR no cambiaron, mientras la actividad de GPx y CAT disminuyeron a las 48 h en las ratas tratadas con  $K_2Cr_2O_7$ . La preinducción de HO-1 con  $SnCl_2$  previno parcialmente el daño renal y el estrés oxidativo en las ratas tratadas con  $K_2Cr_2O_7$ . Dicho efecto fue mayor a las 24 h que a las 48 h y correlaciona con el aumento de la cantidad de HO-1 y de la actividad de HO, que son mayores a las 24 h que a las 48 h. El papel funcional de la HO-1 se probó administrando el inhibidor protoporfirina de zinc (ZnPP) al grupo de  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ , 18 h antes de la administración del  $K_2Cr_2O_7$ . Se observó que la disminución del daño renal y el estrés oxidativo se perdió cuando se inhibió la actividad de la HO. Posteriormente se administró el  $SnCl_2$  al mismo tiempo o 12 h después del  $K_2Cr_2O_7$ . Al administrar al mismo tiempo el  $SnCl_2$  con el  $K_2Cr_2O_7$  no se observó protección y al administrarlo 12 h después del  $K_2Cr_2O_7$  el daño fue mayor que en el grupo que solo recibió  $K_2Cr_2O_7$ . En los grupos control,  $SnCl_2$  y ZnPP no se observaron diferencias en ningún parámetro evaluado. En conclusión, nuestros datos sugieren que la sobre expresión de la HO-1 por  $SnCl_2$  es responsable de la disminución del daño renal y del estrés oxidativo en la IRA por  $K_2Cr_2O_7$  y que esta disminución del daño no se debe a otras enzimas antioxidantes (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GR, y CAT). El efecto del  $SnCl_2$  es preventivo y no terapéutico en el daño renal inducido por  $K_2Cr_2O_7$ .



## ABSTRACT

Heme oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme in the degradation of heme; its inducible isozyme, HO-1, protects against some types of acute tissue injury. In this work we evaluated: (a) the expression and functional role of HO-1 in rats with renal injury induced by potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ), (b) if the protective effect of stannous chloride ( $SnCl_2$ ) (given 12 h before  $K_2Cr_2O_7$ ) is associated with changes in the renal activity of HO-1, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT) 24 and 48 h after  $K_2Cr_2O_7$  injection, and (c) if HO-1 induction is indispensable before  $K_2Cr_2O_7$  injection. Rats were studied 24 h and/or 48 h after a single injection of  $K_2Cr_2O_7$ . To study the protective effect of HO-1 in this experimental model, this enzyme was induced by an injection of  $SnCl_2$  12 h before  $K_2Cr_2O_7$  administration. The functional role of HO-1 in  $K_2Cr_2O_7$ + $SnCl_2$  treated animals was tested inhibiting HO activity with an injection of zinc (II) protoporphyrin IX (ZnPP) 18 h before  $K_2Cr_2O_7$ . In  $K_2Cr_2O_7$ -treated rats: a) renal HO-1 content, measured by western blot, increased and b) renal nitrotyrosine and protein carbonyl content, markers oxidative stress, increased. Renal damage and oxidative stress were ameliorated at 24 and 48 h reaching its maximum at 24 h when HO-1 expression was higher. Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, and GR activities remained unchanged whereas GPx and CAT activities decreased at 48 h in  $K_2Cr_2O_7$ -treated rats. The attenuation of renal injury and oxidative stress was lost by the inhibition of HO activity in  $K_2Cr_2O_7$ + $SnCl_2$ +ZnPP treated animals. To fulfill the objective (c), groups of rats treated with  $K_2Cr_2O_7$  and  $SnCl_2$  (given at the same time or 12 h after  $K_2Cr_2O_7$ ) were studied 24 h after  $K_2Cr_2O_7$ -injection. The simultaneous injections of  $SnCl_2$  and  $K_2Cr_2O_7$  had no protective effect whereas the injection of  $SnCl_2$  12 h after  $K_2Cr_2O_7$  exacerbated renal damage. In conclusion, our data suggest that HO-1 overexpression induced by  $SnCl_2$  is responsible for the attenuation of renal damage and oxidative stress induced by  $K_2Cr_2O_7$  and not with other antioxidant enzymes (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GR, and CAT).  $SnCl_2$  has a preventive and not a therapeutic effect on renal damage induced by  $K_2Cr_2O_7$ .

## ABREVIATURAS

MBG – membrana basal glomerular  
IRA – insuficiencia renal aguda  
BUN – urea en suero  
NTA – necrosis tubular aguda  
ATP - adenosina trifosfato  
ERO – especie reactiva de oxígeno  
ONE – óxido nítrico de endotelina  
ADP – adenosina difosfato  
AMP – adenosina monofosfato  
 $O_2^{\cdot -}$  – anión superóxido  
 $HO_2^{\cdot}$  - radical hidropéroxilo  
 $H_2O_2$  - peróxido de hidrógeno  
 $OH^{\cdot}$  - radical hidroxilo  
 $^1O_2$  - singulete de oxígeno  
 $ONOO^-$  - peroxinitrito  
NO - óxido nítrico  
SOD – superóxido dismutasa  
Cu/Zn-SOD – superóxido dismutasa dependiente de cobre y de zinc  
SOD-EC – superóxido dismutasa extracelular  
Mn-SOD - superóxido dismutasa dependiente de manganeso  
CAT – catalasa  
GPX – glutatión peroxidasa  
GPXc - glutatión peroxidasa citosólica  
GPXp - glutatión peroxidasa plasmática  
GPXgi - glutatión peroxidasa gastrointestinal  
GPXpl - glutatión peroxidasa de fosfolípidos  
GR – glutatión reductasa  
GSSG – glutatión oxidado  
GSH – glutatión reducido  
Prx – peroxirredoxinas  
NADPH – nicotin

HO – hemo oxigenasa  
CO – monóxido de carbono  
FePP – protoporfirina de hierro  
 $K_2Cr_2O_7$  – dicromato de potasio  
 $SnCl_2$  – cloruro de estaño  
NBT – nitroazul de tetrazolio  
DDC - dietilditiocarbamato  
G6PDH - glucosa-6-fosfato deshidrogenasa  
ZnPP - protoporfirina de zinc  
 $MgCl_2$  – cloruro de magnesio  
PBS - amortiguador de fosfatos salino  
NAG - N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa  
CT - control  
 $Na_2CO_3$  – carbonato de sodio  
TCA - ácido tricloroacético  
ASB - albúmina sérica bovina  
H&E - tinción de hematoxilina y eosina  
 $LiCO_3$  – carbonato de litio  
PBS-T - amortiguador de fosfatos salino con tween-20 al 0.1 %  
DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina  
prom – promedio  
E.E.M. – error estándar de la media

## **I. ANTECEDENTES**

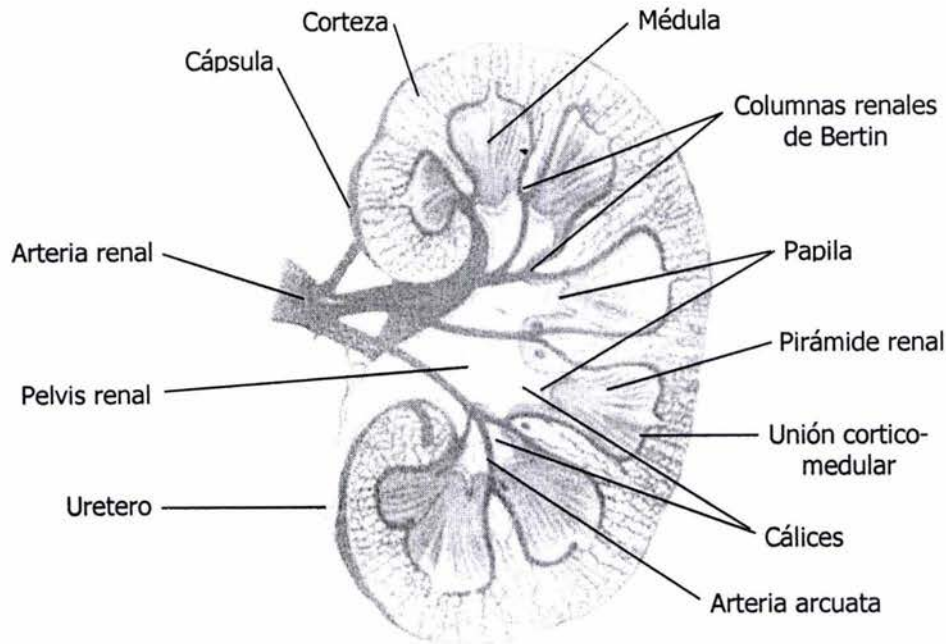
### **1. RIÑÓN**

Los riñones constituyen un órgano par, se localizan en la pared abdominal posterior, a ambos lados de la columna vertebral. Las dimensiones medias del riñón humano son de 12x6x3 cm. El peso medio es de 125-170 g para el hombre y de 115-155 g para la mujer. Cada uno tiene una forma irregularmente ovoidea y aplanada en sentido anteroposterior. El riñón es el encargado de remover del cuerpo los productos terminales del metabolismo de las células, tales como urea, ácido úrico, creatinina, etc. Por otro lado, el riñón tiene la capacidad de regular la presión sanguínea y de retener sustancias que son esenciales para la supervivencia de los individuos (agua, azúcares, aminoácidos, proteínas y electrólitos como sodio, potasio, bicarbonato y cloro). Por consiguiente, el riñón es un órgano regulador que excreta selectivamente y retiene determinadas sustancias, preservando así la constancia del medio ambiente interno del organismo (Heinz, 1983).

Cada riñón tiene dos caras, anterior y posterior, un borde convexo y uno interno cóncavo. Los extremos apical y caudal, o polos superior e inferior, están redondeados (Esquema 1). Si se incide el riñón en un plano paralelo a sus dos caras, la superficie de corte resultante ofrece los siguientes datos anatómicos (Esquema 1). En la periferia se encuentra la cápsula fibrosa propia, blanquecina, de menos de 1 mm de grosor, la cual se desprende con facilidad en el riñón normal. Por debajo de ella hay una banda de aproximadamente 1 cm de grosor, de coloración marrón y aspecto granular que corresponde a la corteza renal. Por debajo de la región cortical existe una segunda zona, la medular, constituida por una serie de estructuras coniformes, de color marrón rojizo brillante, llamadas pirámides de Malpighi, cuyas bases se dirigen hacia fuera en contacto con la corteza, y cuyos vértices o papilas renales se orientan hacia el hilio renal conectando con la porción inicial del sistema excretor, los cálices.

La zona cortical forma una banda periférica y, además se introduce en los espacios comprendidos entre las pirámides; estas prolongaciones internas de la corteza renal se denominan columna de Bertin. La zona medular comprende 8 a 18 pirámides; los ventrículos redondeados o papilas muestran de 10 a 25 pequeños orificios que corresponden a los conductos excretores.

La corteza contiene los glomérulos y las porciones contorneadas proximales y distales de los túbulos renales. La médula posee dos zonas: una interna o papilar que contiene los conductos colectores, segmentos delgados de las asas de Henle y vasos rectos; y otra externa,



**Esquema 1.** Diagrama de un riñón disectado longitudinalmente. Estructuras anatómicas principales (Brenner, 2000).

que a su vez comprende dos bandas interna y externa. La interna contiene las porciones gruesas de las ramas ascendentes de las asas de Henle, segmentos delgados de éstas y túbulos colectores, mientras que la banda externa está formada por las porciones rectas terminales del túbulo proximal y túbulos colectores (Tisher y Madsen, 2000).

### 1.1. NEFRONA

La unidad funcional del riñón es la nefrona (Esquema 2). Cada riñón humano contiene de  $0.4 \times 10^6$  a  $1.2 \times 10^6$  nefronas (Nyengaard y Bendtsen, 1992) y cada riñón de rata contiene 30,000 a 34,000 nefronas aproximadamente (Arturson et al., 1971; Ausiello et al., 1980). El extremo proximal de la nefrona está compuesto por el corpúsculo renal, que comprende un ovillo vascular o glomérulo invaginado en una estructura parecida a un saco denominada cápsula de Bowman (Esquema 3A). Se distinguen en ella dos capas: una que cubre la superficie de los capilares glomerulares (capa epitelial visceral) en todas sus inflexiones, y otra interna de la pared de la cápsula propiamente dicha; esta capa parietal se continúa con el epitelio del túbulo proximal.

Los componentes esenciales de la porción tubular (Esquema 2) son: túbulo proximal (parte contorneada y recta), segmento delgado del asa de Henle, túbulo distal (parte recta y contorneada), túbulos colectores (cortical, conector y recto) (Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

Esta segmentación de la nefrona es un hecho morfológicamente constante, la longitud de la nefrona varía, dependiendo de la posición del glomérulo, de 30 a 55  $\mu\text{m}$ , esta variación se debe únicamente a cambios en la longitud del asa de Henle.

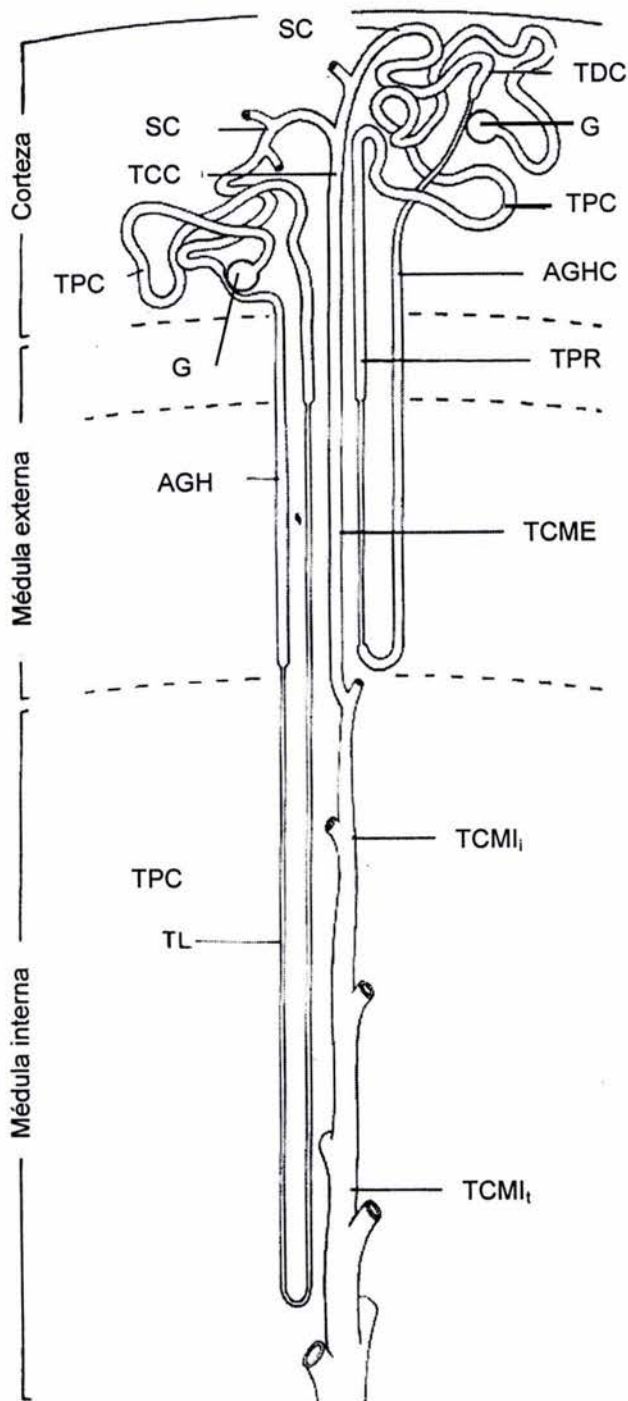
Se reconocen dos poblaciones de nefronas: las que se sitúan en la zona cortical externa, llamadas nefronas corticales, y las localizadas en la unión corticomédular, llamadas nefronas yuxtamedulares. Las nefronas corticales tienen asas de Henle cortas, con segmentos delgados cortos o prácticamente inexistentes; dichas asas profundizan poco en la corteza y en su mayoría no llegan a la médula. En cambio, las nefronas yuxtamedulares poseen asas de Henle largas que profundizan en la médula y llegan incluso hasta la papila renal. En el riñón humano existen aproximadamente siete veces más nefronas cortas que largas (Tisher y Madsen, 2000).

## **1.2. CORPÚSCULO RENAL**

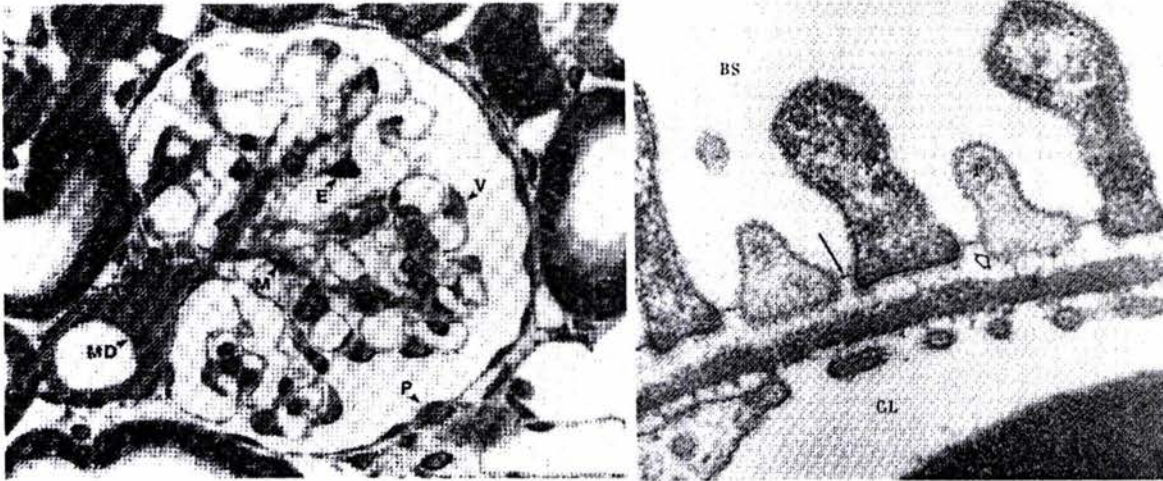
El diámetro glomerular promedio es de 200  $\mu\text{m}$  en el riñón humano y de 120  $\mu\text{m}$  en el riñón de rata (Nyengaard y Bendtsen, 1992).

En la región de transición con el túbulo proximal, las células parietales se vuelven más altas, cúbicas e incluso pueden mostrar microvellosidades en la superficie luminal. En el extremo contrario a la transición con el túbulo proximal pueden observarse áreas de la membrana basal de la cápsula de Bowman tapizadas por pedicelos (extensiones celulares), en lugar del citoplasma de las células parietales (Esquema 3B).

Los pedicelos de los podocitos se asocian entre sí y se interdigitan con los pedicelos procedentes de podocitos vecinos formando un entramado que cubre la superficie externa de la membrana basal glomerular (MBG) (Jones, 1977). La zona estrecha comprendida entre pedicelos vecinos se denomina hendidura de filtración. Este espacio interpedicelar mide de 200 a 600 Å y está aparentemente cerrado en la proximidad de la MBG por una membrana que forma un puente con los pedicelos vecinos.



**Esquema 2.** Diagrama de nefronas yuxtaglomerular (izquierda) y cortical (derecha). G: glomerulo; TPC: túbulo proximal contorneado; TPR: túbulo proximal recto; ADH: asa delgada de Henle; AGHC: asa gruesa de Henle cortical; AGH: asa gruesa de Henle; TDC: túbulo distal contorneado; SC: segmento o túbulo conector; TCC: túbulo o ducto colector cortical; TCME: túbulo conector de médula externa; TCMI<sub>i</sub>: túbulo colector de médula interna inicial; TCMI<sub>t</sub>: túbulo colector de médula interna terminal (Brenner, 2000).



**Esquema 3.** Glomérulo y membrana basal glomerular (MBG). **A.** Microscopía de luz (750X). M: células mesangiales; E: células endoteliales; V: células epiteliales viciales; P: células epiteliales parietales; MD: mácula densa; CB: cápsula de Bowman **B.** Microscopía electrónica (120,000X). P: pedicelos; CL: lumen capilar; BS: espacio de Bowman; 1: lámina rara externa; 2: lámina densa; 3: lámina rara interna; 1+2+3: lámina fenestrada endotelial (Brenner, 2000).

Las funciones más importantes de los podocitos son: participación junto con el endotelio en la síntesis de la MBG (Kurtz y Feldman, 1962) y ser parte de la barrera de filtración.

### 1.3. BASES MORFOLÓGICAS DE LA FILTRACIÓN GLOMERULAR

La pared del capilar glomerular constituye una barrera física al proceso de filtración glomerular. Las capas formadas por la disposición apretada de los pedicelos, las membranas de las hendiduras interpedicelares, la MBG y la lámina fenestrada endotelial representan distintos grados de "filtros" que se oponen al libre paso de las partículas (Esquema 3B).

Todos los estudios realizados ofrecen diámetros porosos diferentes, debido a ello existen varias teorías de la pared capilar como filtro. La teoría isoporosa propone que la pared capilar tiene poros de 35-42 Å de diámetro. La teoría heteroporosa admite la existencia de dos poblaciones de poros: pequeños poros, con diámetros de 20-28 Å, y grandes poros de 80 Å. La proporción entre pequeños y grandes poros sería 1:10,000.

El glomérulo puede, además, discriminar entre distintas moléculas según su carga eléctrica. En estudios de depuración utilizando dextranos y moléculas proteínicas de diferentes punto isoelectrico (pI), se observa que permite mayor penetración de moléculas neutras y



catiónicas con respecto a moléculas aniónicas de las mismas dimensiones (Deen, 1982). Esta restricción dependiente de la carga es un factor importante para la exclusión prácticamente total de la albúmina en el filtrado, ya que la albúmina es una molécula aniónica con un pI de 4.5 aproximadamente.

#### **1.4. SISTEMA TUBULAR DE LA NEFRONA**

##### **1.4.1. TUBULO PROXIMAL**

El túbulo proximal tiene un largo de aproximadamente 8 mm en el riñón de rata, de 10 mm en el conejo y de 14 en el humano (Nyengaard y Bendtsen, 1992). Con microscopía óptica se reconoce por la eosinofilia de las células tubulares, límites citoplasmáticos poco precisos, presencia de ribete en cepillo luminal y núcleos redondeados de localización mediobasal.

En el tejido fijado después de la biopsia, el túbulo se colapsa de modo que la luz no es aparente. Este artefacto no se aprecia en los tejidos con técnicas de perfusión (Tisher y Madsen, 2000). Tanto en microscopía óptica como electrónica se distinguen dos porciones tubulares: la inicial o túbulo contorneado proximal y la parte recta o segmento grueso de la rama descendente del asa de Henle (Rhodin, 1971).

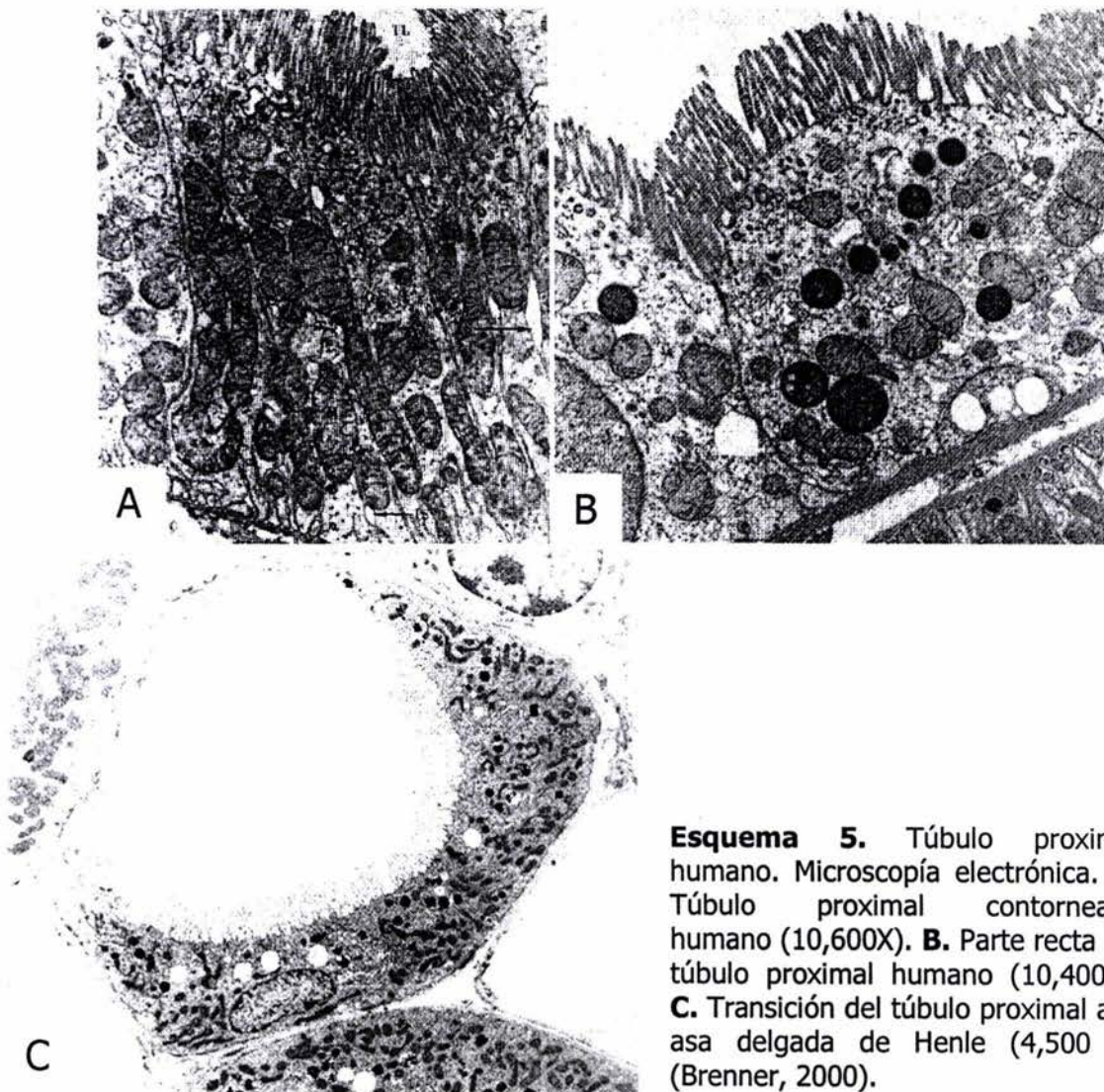
En algunas especies (conejo, rata) (Kaissling y Kriz, 1979; Maunsbach, 1966) se pueden distinguir tres segmentos (S1, S2, S3) especializados y morfológicamente diferenciables ultraestructuralmente en el túbulo proximal. En el riñón humano, esta división no es tan clara, y sólo se distinguen los dos segmentos señalados antes (Tisher et al., 1966).

##### **1.4.2. TÚBULO CONTORNEADO PROXIMAL**

Las células epiteliales que constituyen el túbulo contorneado proximal tienen una forma compleja. Su superficie luminal tiene dos características fundamentales: gran riqueza de microvellosidades y un sistema de túbulos apicales (Esquema 5). Las microvellosidades están constituidas por proyecciones cilíndricas de la membrana celular de la superficie luminal, se disponen de modo seriado, en paralelo y en su interior hay presentes de 4 a 7 filamentos longitudinales que con frecuencia se distinguen en la región apical del citoplasma celular. Esta modificación de la membrana celular forma el borde en cepillo observable con microscopía óptica y se calcula que incrementa la superficie luminal 40 veces, aumentando con ello la capacidad de reabsorción tubular (Welling y Welling, 1975). Es en esta sección de la nefrona donde se lleva a cabo la reabsorción de la mayoría de las moléculas indispensables para el organismo (glucosa, aminoácidos, agua, proteínas de bajo peso molecular, iones como  $\text{Na}^+$ ,

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, etc.) (Heinz, 1983; Brenner, 2000). Diversos estudios indican la presencia de un aparato endocítico-lisosomal en la base de las microvellosidades, el cual está involucrado en los procesos de reabsorción y de degradación de macromoléculas.

Por otro lado, la reabsorción de metabolitos de bajo peso molecular está acoplado al transporte activo del sodio por parte de las ATPasas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y ATPasa de Na<sup>+</sup> las cuales se encuentran en la parte basolateral de las células.



Los núcleos de las células del túbulo contorneado proximal son redondos y de localización media. Los organelos citoplasmáticos más abundantes son las mitocondrias y diferentes tipos de cuerpos densos.

En los lisosomas del túbulo proximal se acumulan sustancias tales como antibióticos amiglicósidos (Kaloyanides y Pastoriza-Muñoz, 1980) y ciertos metales pesados (Madsen, 1980; Dartsch et al., 1998), que dan lugar a cambios estructurales y funcionales en el sistema lisosomal.

### **1.4.3. TÚBULO PROXIMAL RECTO**

La parte recta es el segmento grueso de la rama descendente del asa de Henle. El epitelio tubular de la parte recta es cúbico, persiste el ribete de cepillo, la cantidad y altura de los microvellosidades disminuyen y el sistema de túbulos apicales es menos prominente (Tisher et al., 1966).

El núcleo adquiere una posición basal y la cantidad de organelos disminuye, fundamentalmente los lisosomas y peroxisomas. Las mitocondrias disminuyen de tamaño y se distribuyen por todo el citoplasma (Tisher et al., 1966; Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

### **1.4.4. SEGMENTO DELGADO DEL ASA DE HENLE**

Es de longitud variable, desde prácticamente inexistente hasta 10 mm de longitud. Su diámetro es de 15  $\mu\text{m}$  y representa el segmento más estrecho de la nefrona. Este segmento está tapizado por células aplanadas morfológicamente semejantes a las endoteliales (Esquema 5), lo que condiciona una luz amplia a pesar del escaso diámetro total del segmento (Tisher et al., 1966).

Las células tubulares a este nivel tienen escaso citoplasma y el núcleo produce una discreta prominencia hacia la luz. La superficie luminal muestra ocasionales microvellosidades cortas. La superficie basal es recta, el citoplasma es pobre en organelos. Las mitocondrias son pequeñas, esféricas y no muestran ninguna distribución especial. Los lisosomas y peroxisomas están prácticamente ausentes (Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

Utilizando diversos animales de laboratorio se confirmó la existencia de cuatro segmentos diferentes morfológicamente en el segmento delgado del asa de Henle (Dieterich et al., 1975; Kaissling y Kriz, 1979; Katz et al., 1979; Schwarz y Venkatachalm, 1974). En el riñón humano también se observan patrones morfológicos aunque su relación con los segmentos delgado y descendente no se conoce totalmente.

#### **1.4.5. TÚBULO DISTAL**

Este segmento mide unos 14-16 mm y se distinguen tres partes en el túbulo distal: el segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle (parte recta), la mácula densa y el túbulo contorneado.

En cortes de tejido analizados con microscopía de luz, el túbulo distal se distingue del proximal por su menor diámetro, ausencia del borde en cepillo, células cúbicas y bien delimitadas, citoplasma claro y mayor número de núcleos por cada sección transversal del túbulo (Esquema 7) (Tisher y Madsen, 2000).

Desde el punto de vista ultraestructural existe una transición brusca entre el segmento delgado del asa de Henle y la parte contorneada del túbulo distal (Esquema 7). Las células aplanadas se continúan con células de mayor altura que de modo brusco se tornan cuboides. Las superficies laterales son rectas, y la membrana celular basal forma múltiples repliegues basales de gran longitud semejantes a los del túbulo proximal. Los núcleos adoptan una posición media apical y en el citoplasma destaca como rasgo fundamental la elevada cantidad de mitocondrias cilíndricas de gran longitud.

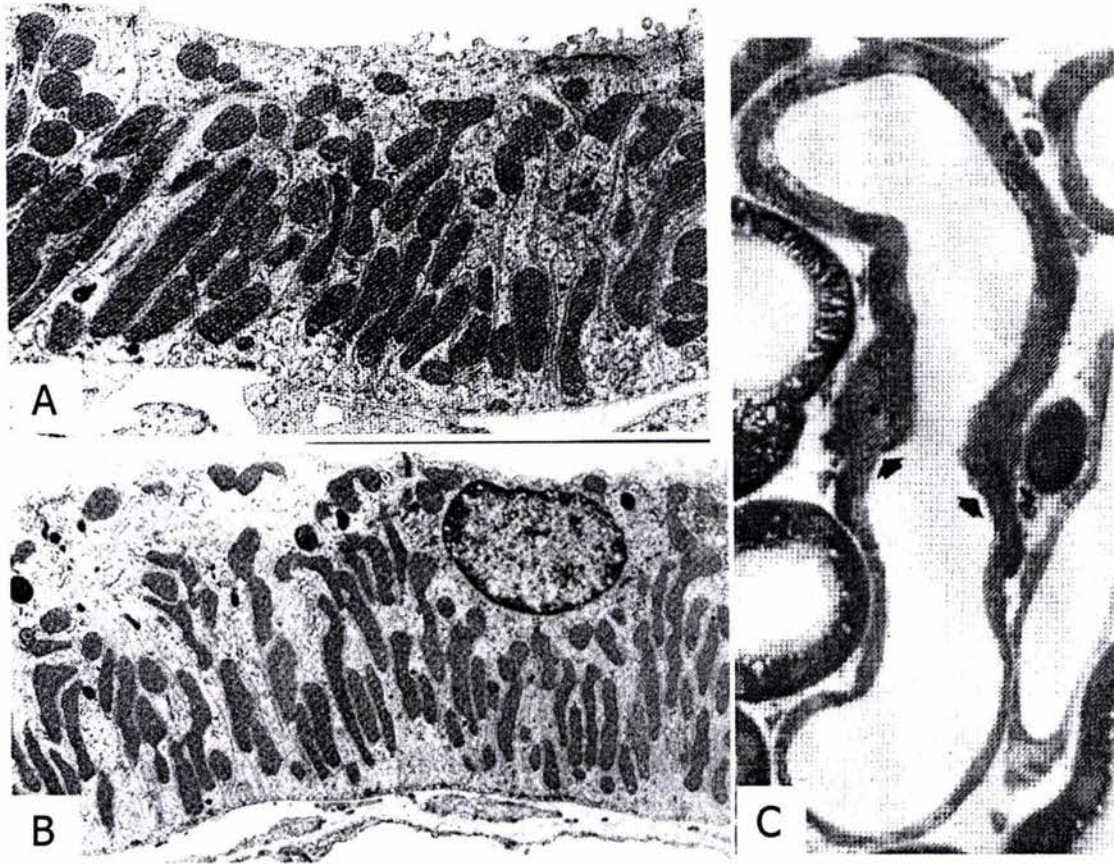
Las células epiteliales de la porción contorneada distal muestran superficies lumbales convexas, provistas de escasas microvellosidades cortas. La luz es siempre permeable independiente del método de fijación. Las superficies laterales son rectas y existen pocas interdigitaciones laterales. Los complejos de unión se observan en el extremo luminal. Los pliegues basales están bien desarrollados, al igual que en la parte recta, si bien se atenúa su cifra a medida que el túbulo distal se aproxima al sistema colector.

#### **1.4.6. SISTEMA DE TÚBULOS COLECTORES**

La longitud total del sistema colector es de 20-22 mm, su diámetro va aumentando distalmente y ocupa diferentes posiciones en el parénquima renal (Tisher y Madsen, 2000).

El epitelio colector es cuboideo en la zona cortical y va aumentando de altura hasta ser columnar en la zona medular. Se distinguen dos tipos ultraestructurales de células tubulares colectoras: las principales (claras) y las intercalares (oscuras).

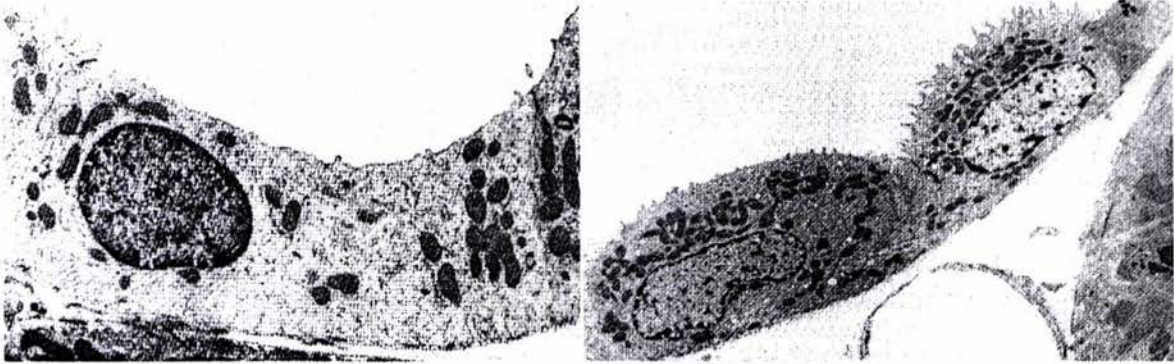
Las células principales (Kaissling y Kriz, 1979) son el tipo celular predominante a través de todo el sistema colector (Esquema 8). Estas células tienen citoplasma de aspecto claro por su pobreza en organelos; contienen escasas mitocondrias pequeñas y esféricas distribuidas al azar. El núcleo es de localización central o mediobasal. El borde luminal es convexo y está dotado de ocasionales microvellosidades cortas y de una estructura ciliar por célula.



**Esquema 7.** Asa de Henle y túbulo distal. Microscopía electrónica (A,B) y de luz (C). **A.** Asa delgada ascendente de Henle (13,000X). **B.** Túbulo distal contorneado (10,000X). **C.** Transición del asa delgada al túbulo distal contorneado (2,700X) (Brenner, 2000).

El sistema de túbulos colectores tiene diversas funciones fisiológicas que incluyen secreción de iones hidrógeno y reabsorción de bicarbonato, secreción y reabsorción de potasio, secreción de amonio y magnesio, reabsorción de agua, transporte de sodio y cloruros, y transporte de calcio.

Diversos estudios fisiológicos y morfológicos indican que todo el sistema colector participa en la reabsorción de agua como respuesta a la hormona antidiurética (Woodhall y Tisher, 1973), además de intervenir en la secreción de potasio (Stanton et al., 1981). También hay evidencia de que el sistema colector participa en la acidificación de la orina mediante la secreción de iones hidrógeno (Stone et al., 1983) sugiriéndose que las células intercalares son un sitio de secreción de estos iones.



**Esquema 8.** Túbulo colector. Microscopía electrónica (9,000X). **A.** Célula principal. **B.** Células intercalares tipo A (derecha) y tipo B (izquierda) (Brenner, 2000).

### **1.5. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)**

La IRA es un síndrome caracterizado por una rápida disminución de la filtración glomerular, lo que ocasiona la acumulación de productos finales del metabolismo, como por ejemplo los compuestos nitrogenados tales como urea y creatinina. La insuficiencia renal aguda es generalmente asintomática y se detecta al realizar un perfil bioquímico, generalmente en pacientes intrahospitalarios, detectándose un incremento en los niveles de creatinina y nitrógeno de urea en suero (BUN). Una característica frecuente pero no invariable de esta enfermedad es la oliguria, presente en el 50% de los casos (Danovitch et al., 1979).

La IRA está asociada con el aumento de la morbilidad y mortalidad intrahospitalaria debido a la severidad de su naturaleza de enfermedad oculta y la alta incidencia de complicaciones.

La IRA se clasifica en tres categorías dependiendo de su origen:

1. IRA prerenal (azotemia prerenal). La IRA prerenal es una enfermedad caracterizada por una hipoperfusión renal en la cual la integridad del tejido renal es preservado y representa entre 55 y el 60% de los casos de IRA. La filtración glomerular en esta enfermedad es corregida rápidamente una vez que se restaura la perfusión renal y la presión de ultrafiltración. La IRA prerenal puede complicar cualquier enfermedad caracterizada por hipovolemia, insuficiencia cardíaca, vasodilatación sistémica o vasoconstricción intrarenal.

2. IRA intrínseca (azotemia intrínseca). Enfermedad donde se ve comprometido el tejido renal y representa el 35 y el 40% de los casos de IRA.
3. IRA postrenal (azotemia postrenal). Tiene una frecuencia menor al 5%. La IRA postrenal es una enfermedad asociada con una obstrucción aguda del flujo urinario entre la uretra y el cuello de la vejiga o una obstrucción bilateral de ureteros. Este tipo de IRA puede complicar enfermedades como la hipertrofia, neoplasia o infección.

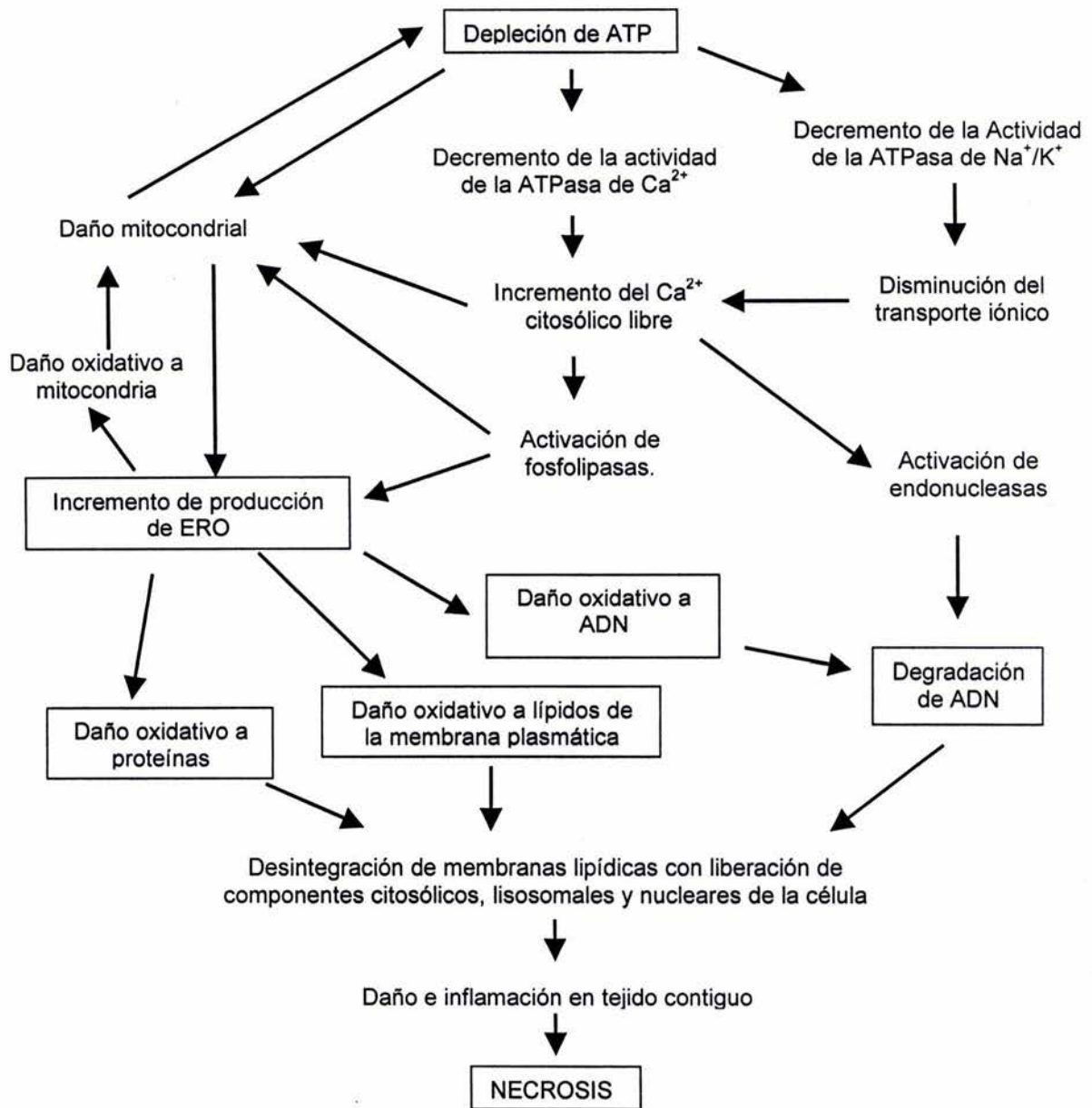
### 1.5.1. IRA INTRÍNSECA

Desde el punto de vista clinicopatológico la azotemia intrínseca se clasifica en 1) enfermedades que involucran vasos renales grandes; 2) enfermedades de la microvasculatura y del glomérulo; 3) necrosis tubular aguda (NTA) isquémica y nefrotóxica; y 4) otros procesos que involucran al intersticio (Tabla I). La NTA isquémica y nefrotóxica representan el 90% de los casos de IRA intrínseca.

Tabla I. Causas frecuentes de IRA intrínseca.

Enfermedades de:	Causas:
Vasos renales	Arterial renales: trombosis, ateroembolismo, disección, vasculitis Venas renales: trombosis, compresión
Microvasculatura y glomérulo	Inflamación: glomerulonefritis aguda, vasculitis, radiación Vasos renales: hipertensión maligna, toxemia en el embarazo, hypercalcemia, fármacos, radiocontrastantes Hematológicas: síndrome urémico hemolítico, trombocitopenia purpura, coagulación intravascular diseminada
Túbulos renales (NTA)	Isquemia por hipoperfusión Toxinas exógenas: antibióticos, venenos, radiocontrastantes, anticancerígenos Toxinas endógenas: mioglobina, hemoglobina, ácido úrico
Tubulointersticio	Nefritis intersticial alérgica: antibióticos, anti-inflamatorios no esteroideos Infecciones: viral, bacteriana, fungal Infiltración: linfoma, leucemia, sarcoma

### 1.5.2. PATOFISIOLOGÍA DE LA IRA INTRÍNSECA O NECROSIS TUBULAR AGUDA (NTA)



**Esquema 9.** Diagrama de las alteraciones metabólicas asociadas al daño renal agudo.



### **1.5.2.1. ALTERACIONES HEMODINÁMICAS EN LA NTA**

En algunos modelos de NTA se observó una disminución de la filtración glomerular. Sin embargo no hay evidencia clara de que exista vasoconstricción en el riñón debido a los nefrotóxicos (Lieberthal, 1997). En diferentes modelos de IRA inducida por nefrotóxicos (rabdomiólisis, cisplatino y radiocontraste), se bloqueó la función del endotelio (Hughes et al., 1996) y se demostró una disminución de las anomalías asociadas con la IRA (Karam et al., 1995; Fogo et al., 1992; Cantley et al., 1993). En la IRA experimental inducida por ciclosporina, hemoglobinuria o mioglobina se observó una reducción en la liberación endotelial de óxido nítrico a la circulación renal (Lau et al., 1989; Motterlini et al., 1996; Radermacher et al., 1990). Una deficiencia del NO puede causar vasoconstricción debido a que normalmente regula el tono vascular a nivel local, favoreciendo la vasodilatación (Radermacher et al., 1990). Adicionalmente, se sabe que la producción excesiva de vasoconstrictores está implicada en la IRA. El papel específico de los agentes vasoactivos liberados por las células endoteliales puede variar de acuerdo al tipo de causa de la IRA (Arakawa et al., 1996; Kelly et al., 1996; Rudnick et al., 1996).

### **1.5.2.2. DISFUNCIÓN EN LA NTA**

La IRA se divide en tres fases: La primera o fase de iniciación es el período donde el daño al parénquima renal empieza a evolucionar y puede durar horas o días. La segunda o fase de mantenimiento es el período donde el daño al parénquima renal está ya establecido, la tasa de eliminación de orina generalmente es la más baja en este período. La tercera o fase de recuperación es el período donde los individuos recobran la función renal a través de procesos de reparación y regeneración del tejido renal.

Los cambios morfológicos en la IRA se dividen en tres fases: la primera se caracteriza por una disminución de las áreas apicales y laterales de las células. Es decir la membrana en borde en cepillo puede disminuir o incluso desaparecer, debido a que se desprende de la superficie apical, o bien, puede internalizarse y aparecer en vacuolas. La segunda fase se caracteriza por la muerte de las células y/o descamación de las mismas, las cuales se acumulan en el lumen de los túbulos promoviendo obstrucción de los mismos. La tercera fase se caracteriza porque las células sobrevivientes proliferan rápidamente y su aspecto es aplanado e hiper cromático (Brenner, 2000).

La IRA intrínseca ocasionada por nefrotóxicos es frecuentemente llamada NTA debido a la necrosis tubular que es asociada. La NTA es causada por isquemia o tóxicos como

antibióticos, anestésicos, medios de contraste, venenos, inmunosupresores, solventes orgánicos o metales pesados (Sánchez, 1993; Dishart y Kellum, 2000; Wedeen y Qian, 1991).

La NTA se caracteriza por la generación de una serie de alteraciones estructurales y moleculares de las células tubulares, tales como aparición de especies reactivas de oxígeno (Baud y Ardaillou, 1993; Rovin et al., 1990), pérdida del borde en cepillo, disminución o desaparición de los procesos de absorción y excreción, aparición de hipoxia, incremento de calcio citosólico, disfunción mitocondrial, descenso en los niveles de ATP y ADP, aumento de AMP, acidosis intracelular y abultamiento de las células epiteliales, que junto con restos necróticos de estas células, contribuye a la obstrucción tubular (Brenner, 2000; Sánchez, 1993).

### **1.5.2.3. RESPUESTA METABÓLICA AL DAÑO**

#### **1.5.2.3.1. Depleción de ATP**

Una caída de los niveles de ATP se puede deber a isquemia, hipoxia o anoxia siendo este evento muy importante en la disfunción y muerte celular. Cuando las células son expuestas a condiciones citotóxicas, como el estrés oxidativo, el daño inicial puede no ser la depleción del ATP sino daño a los componentes celulares, como proteínas y lípidos. Consecuentemente, la exposición a condiciones citotóxicas llevan al daño mitocondrial y a la depleción de ATP que ocurre como evento secundario. Cuando la falta de oxígeno o el daño se prolonga, la degradación del ATP aumenta los niveles de AMP y si este no es utilizado para la síntesis de ATP, como ocurre en condiciones normales, el AMP es rápidamente metabolizado a nucleósidos (adenosina e inosina) e hipoxantina. Estos metabolitos de purina difunden pasivamente de la célula reduciendo la concentración de precursores para una rápida síntesis de ATP durante la reperfusión o el retiro del tóxico (Brady et al., 1996; Lieberthal, 1997). Los tres factores más importantes que determinan la sensibilidad de las células de los túbulos renales son el requerimiento de energía, su capacidad glicolítica y la severidad del daño al cual la célula está expuesta (Lieberthal y Nigam, 1998).

#### **1.5.2.3.2. Edema celular**

En presencia de energía adecuada, la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  transporta hacia afuera de la célula sodio, lo que induce al cloro a moverse pasivamente hacia el exterior de la célula. La depleción de ATP compromete la función de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  acumulando electrolitos y agua en el interior de las células. Todo esto da como resultado un incremento del volumen

celular que se manifiesta como un edema o hinchazón y es la primera característica típica de la necrosis (Levine et al., 1996).

#### **1.5.2.3.3. Incremento del calcio intracelular**

La concentración de calcio libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juega un papel muy importante en el daño celular (Edelstein y Schrier, 1995). Existen varios mecanismos por los cuales el calcio puede contribuir al daño celular. Por una parte, el calcio puede activar diversas enzimas, incluyendo fosfolipasas, proteasas y endonucleasas (Edelstein y Schrier, 1995), las cuales probablemente contribuyan a la necrosis. Por otro lado el calcio también daña directamente a la mitocondria, que normalmente se introduce calcio mediante un transportador uniporte presente en su membrana interna. La sobrecarga mitocondrial de calcio resulta en un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo cual tiene dos efectos adversos. El primero es que no hay producción de ATP lo que exacerba la depleción del ATP. El segundo efecto nocivo es la generación del radical superóxido, lo que contribuye al daño por estrés oxidativo (Levine et al., 1996).

#### **1.5.2.3.4. Activación de fosfolipasas**

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan fosfolípidos y al estar activadas disminuye la disponibilidad de moléculas que son indispensables en el metabolismo normal. Por ejemplo el ácido araquidónico interviene en la fosforilación oxidativa y en la actividad de la  $\text{ATPase}$  de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , lo que conduce a la depleción y disminución de la síntesis de ATP. El ácido araquidónico también es precursor de metabolitos, como tromboxanos y leucotrienos, que actúan como agentes pro-inflamatorios con lo cual exacerban el daño. Además, la enzima que convierte al ácido araquidónico en sus subproductos libera anión superóxido con lo cual contribuye al daño por estrés oxidativo (Levine et al., 1996).

#### **1.5.2.3.5. Activación de proteasas**

La calpaína, una proteasa no lisosomal y dependiente de calcio, regula múltiples eventos intracelulares, incluyendo la actividad de canales de membrana, función de receptores de membrana, activación de cinasas e interacción de proteínas de citoesqueleto. La calpaína es activada luego de hipoxia o estrés tóxico en células de túbulo renales (Schnellman y Williams, 1998).

El aumento de calcio también activa a proteasas dependientes de calmodulina que a su vez convierte a la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. La xantina oxidasa la cual convierte la xantina a hipoxantina con producción de superóxido, lo que también contribuye al daño por estrés oxidativo.

#### **1.5.2.3.6. Activación de endonucleasas**

La activación de serin proteasas dependientes de calcio que en particular parecen estar involucradas en la activación de las endonucleasas encargadas del tipo de degradación de ADN que ocurre en la necrosis (Dong et al., 1997). La degradación aleatoria del ADN es una característica de una necrosis avanzada y produce un barrido de fragmentos de ADN de bajo peso molecular en una electroforesis en gel.

#### **1.5.2.3.7. Daño oxidativo (estrés oxidativo)**

Existen muchas fuentes de generación de radicales libres, en particular del anión superóxido en los procesos antes mencionados, esto origina otras especies reactivas (radical hidroxilo y peroxinitrito) que se conoce reaccionan con moléculas biológicas generando disfunción (Janssen et al., 1993; Peresleni et al., 1996).

## **2. CROMO**

El cromo es el sexto elemento más abundante de la tierra y solo se encuentra en combinación con otros elementos. Los compuestos del cromo son utilizados principalmente en 3 tipos de industrias: química, metalúrgica y de material refractario (material resistente al calor). Es en estas industrias es donde ocurre la exposición ocupacional a estos compuestos. Los estados de oxidación más estables del cromo son  $3^+$  y  $6^+$ , por tanto los compuestos que forma el cromo son con dichos estados de oxidación. El cromo trivalente es mas estable, que el cromo hexavalente. La toxicidad de los compuestos de cromo depende del estado de oxidación del cromo. En promedio la dosis letal del cromo hexavalente es de 1-3 g en cambio el cromo trivalente es relativamente no tóxico. El cromo hexavalente es un oxidante muy fuerte, especialmente en medio ácido (Barceloux, 1999). Dependiendo de la vía por donde el compuesto de cromo hexavalente ingrese al cuerpo, puede ocasionar sensibilización de la piel, el pulmón, irritación generalizada de la conjuntiva y mucosas membranales, perforaciones nasales y dermatitis. En cambio el cromo trivalente es un elemento traza necesario para la formación del factor de tolerancia a la glucosa y para el metabolismo de insulina (Bencko, 1985).

### **2.1. DICROMATO DE POTASIO ( $K_2Cr_2O_7$ ).**

El  $K_2Cr_2O_7$  es un compuesto que no existe naturalmente sino es sintetizado (Barceloux, 1999), y es mucho mas soluble en agua que el cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ). El primer uso de este compuesto fue como pigmento (amarillo y naranja). El  $K_2Cr_2O_7$  es utilizado para la

inhibición de la corrosión, el cromado, preparación de limpiadores de cristales, preservación de maderas, fabricación de fósforos, terminados de metales y producción de pigmentos. En la industria metalúrgica se utiliza en la fabricación de acero inoxidable, de hierro colado y de aleaciones ferrosas. Este compuesto, por su alto punto de fusión y resistencia al ácido, es ideal en la fabricación de material refractario (Barceloux, 1999). La mayor exposición a este compuesto ocurre durante la preparación de ferrocromo, pigmentos de cromo, platinados de cromo y soldadura de acero inoxidable (Barceloux, 1999).

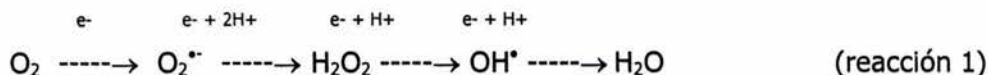
El  $K_2Cr_2O_7$  en solución se disocia en iones potasio y dicromato ( $K^+$  y  $Cr_2O_7^{2-}$ ), y al encontrarse en medio básico, se favorece la formación de anión cromato ( $CrO_4^{2-}$ ). Sin embargo en ambos iones el estado de oxidación del cromo es  $6^+$ .

En condiciones fisiológicas, se favorece la formación de ión cromato ( $CrO_4^{2-}$ ). La vida media del Cr(VI) en plasma es de 39 h (De Flora y Wetterhahn, 1989) y entra a las células por acción de un sistema de transporte aniónico para fosfatos y sulfatos (Dartsch et al., 1998; Jennette, 1981). Se acumula principalmente en hígado y en riñón, siendo afectada la función de ambos (Laborda et al., 1986). En el riñón provoca NTA (Dartsch et al., 1998; Ellis et al., 1982; Franchini et al., 1978; Liu y Shi, 2001; Pedraza-Chaverrí et al., 1995b; Tandon et al., 1979; Wedeen y Qian, 1991).

### **3. ESTRÉS OXIDATIVO**

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva. Dentro de estas especies reactivas las que son de mayor interés para la biología o la clínica son aquellas derivadas del oxígeno (Zentella y Saldaña, 1996). El oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aeróbicos; sin embargo, a altas concentraciones puede llegar a ser tóxico debido a la producción de especies reactivas. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno en los sistemas biológicos y son sintetizadas y degradadas por todos los organismos aeróbicos. Las ERO juegan un papel importante en el sistema inmune (Forman y Torres, 2001; Rice-Evans, 1994) y son mediadoras en la regulación de la transducción de señales involucradas en procesos de diferenciación y crecimiento celular (Burdon y Rice-Evans, 1989; Sauer et al., 2001). El oxígeno molecular generalmente acepta cuatro electrones y es convertido directamente a agua (reacción 1) en la cadena respiratoria mitocondrial mediante

el complejo citocromo oxidasa (Granados-Silvestre, 1999), la reacción se lleva a cabo secuencialmente:



Las ERO se encuentran en un rango de concentración de  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-9}$  M al ser generados por el metabolismo normal y no viajan muy lejos de los sitios de donde se originaron debido a que su vida media es de unos cuantos microsegundos (Zentella et al., 1994; Florence, 1990). Cuando por alguna razón se produce un exceso de radicales libres en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser ineficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidativo. Durante un estado de estrés oxidativo estructuras celulares pueden sufrir daño por alteraciones en las macromoléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo cual al ser muy severo, puede conducir a la muerte celular.

Al interaccionar las ERO con las proteínas, se produce la oxidación de los residuos de aminoácidos (prolina, histidina, arginina y cisteína) (Griffiths et al., 1988; Yu, 1994) y se provocan cambios conformacionales que pueden generar una disminución parcial o total de su actividad (Butterfied et al., 1998; Stadtman y Berlett, 1998) y hacer que la proteína sea más susceptible a agregación y digestión proteolítica (Griffiths et al., 1988).

Los radicales libres tienen la facultad de sustraer átomos de hidrógeno de ácidos grasos poliinsaturados, provocando la formación de enlaces dieno. Lo anterior induce alteraciones en la cohesividad de la membrana lipídica, así como en su organización estructural y como consecuencia pueden desencadenar alteraciones en las proteínas de membrana (Griffiths et al., 1988).

En los ácidos nucleicos, las ERO pueden provocar hidroxilaciones de las bases (la timina y la citosina son las bases más susceptibles), lo que genera entrecruzamiento ADN-proteínas y rompimiento de las cadenas de ADN. Lo anterior puede provocar mutaciones y/o inhibición de la expresión génica (Nordberg y Arnér, 2001; Fraga et al., 1990). Estos efectos son ocasionados por la reacción de los ácidos nucleicos con el radical hidroxilo.

### 3.1. Anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ )

El anión superóxido es la primera especie reactiva de oxígeno formada durante la reducción univalente del oxígeno (Esquema 10). Se forma cuando el oxígeno gana un electrón.

Bajo condiciones normales es producido en bajas concentraciones por diferentes sistemas enzimáticos capaces de generar al anión superóxido, tales como el sistema xantina/xantina oxidasa (Luo et al., 2001); la lipooxigenasa (Takano et al., 2001); la ciclooxigenasa (Rieger et al., 2002); y la NADPH oxidasa (Li et al., 2002), siendo las cadenas transportadoras de electrones la fuente más importante de generación del anión superóxido (Nordberg y Arnér, 2001; Sauer et al., 2001). El anión superóxido tiene la facultad de interactuar con otras moléculas, como el peróxido de hidrógeno en presencia de trazas de algún metal de transición, para dar lugar a la formación de compuestos oxidantes más potentes como son el singulete de oxígeno y el radical hidroxilo (Khan y Kasha, 1994). El anión superóxido posee la facultad de dismutar a peróxido de hidrógeno (Freeman, 1984; Bannister y Rotilio, 1987) y, según algunos autores, en este proceso de dismutación también se puede generar el singulete de oxígeno (Corey et al., 1987). Las reacciones de dismutación consisten en la transferencia de un electrón de una molécula de superóxido a otra generando una molécula de peróxido de hidrógeno y una molécula de oxígeno. Existen tres propuestas para la reacción de dismutación (reacciones 2, 3, 4), además se sabe que el proceso de dismutación ocurre muy rápido a pH 4.8; sin embargo, a pH fisiológico esta reacción es lenta (Olinescu y Smith, 2002).



Donde el radical hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) es la forma protonada del anión superóxido.

Se calcula que del oxígeno respirado del 1 al 3% es usado para formar anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) tanto en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria como en el retículo endoplásmico. Estas reacciones son inevitables en un organismo dependiente del oxígeno. Además este radical, también es producido por los fagocitos como parte del mecanismo empleado para erradicar organismos extraños como bacterias (Murav'ev et al., 2002).

### 3.2. Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es formado en los organismos durante las reacciones de oxidación de quinonas, por la oxidación de compuestos que contienen grupos sulfidrilos, por la dismutación del anión superóxido, o bien por la acción de la enzima superóxido dismutasa (Freeman, 1984). Este compuesto no es un radical en sí debido a que tiene todos sus electrones

apareados. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un agente oxidante y/o reductor débil y por consiguiente es poco reactivo; sin embargo, puede difundir a través de las membranas biológicas, tal como ocurre en las membranas mitocondriales (Nath y Norby, 2000). Además es capaz de promover la producción de radicales hidroxilo debido a que tiene la capacidad de interaccionar con metales de transición que tienen actividad redox (reacción 5) (Halliwell y Gutteridge, 2001). Sin embargo, el peróxido de hidrógeno participa en los procesos de señalización intracelulares (Nordberg y Arnér, 2001).

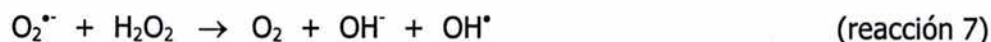
### 3.3. Radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>)

Este compuesto está considerado como el oxidante más potente en los sistemas biológicos debido a que reacciona con casi todas las moléculas biológicas (Fong et al., 1976). La generación del OH<sup>•</sup> ocurre mediante dos vías. La primera denominada reacción de Fenton (reacción 5), que se caracteriza por la interacción de metales de transición con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nordberg y Arnér, 2001; Rieger et al., 2002; Urbanski y Beresewicz, 2000); así mismo, en esta reacción el anión superóxido juega un papel importante en el reciclamiento de los iones metálicos:



La fuente de metales de transición puede ser proteínas encargadas de su transporte como la ferritina o la metalotioneina (Harris et al., 1994) y los centros hierro-azufre de algunas proteínas desnaturalizadas al interaccionar con el anión superóxido (Nordberg y Arnér, 2001).

La segunda vía generadora de radicales hidroxilo es la denominada Haber-Weiss (reacción 7) donde participa el anión superóxido, sin embargo, esta reacción en los sistemas biológicos es más lenta que la reacción de Fenton (Khan y Kasha, 1994).



El OH<sup>•</sup> es uno de los agentes más reactivos ya que interactúa prácticamente con la estructura molecular más cercana y la célula no tiene mecanismos antioxidantes enzimáticos que puedan combatirlo; por lo tanto, las células tienen que prevenir su formación mediante la eliminación de los precursores, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El OH<sup>•</sup> puede oxidar a estructuras celulares y/o



moléculas orgánicas que se encuentren alrededor de 20 Å de distancia, generando peróxidos orgánicos como en el caso de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares (Halliwell, 1991; Hynder y Stein, 1991; Olinescu y Smith, 2002) y con la participación del oxígeno molecular, promueve la degradación de los ácidos grasos a malondialdehído.

### **3.4. Singulete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ )**

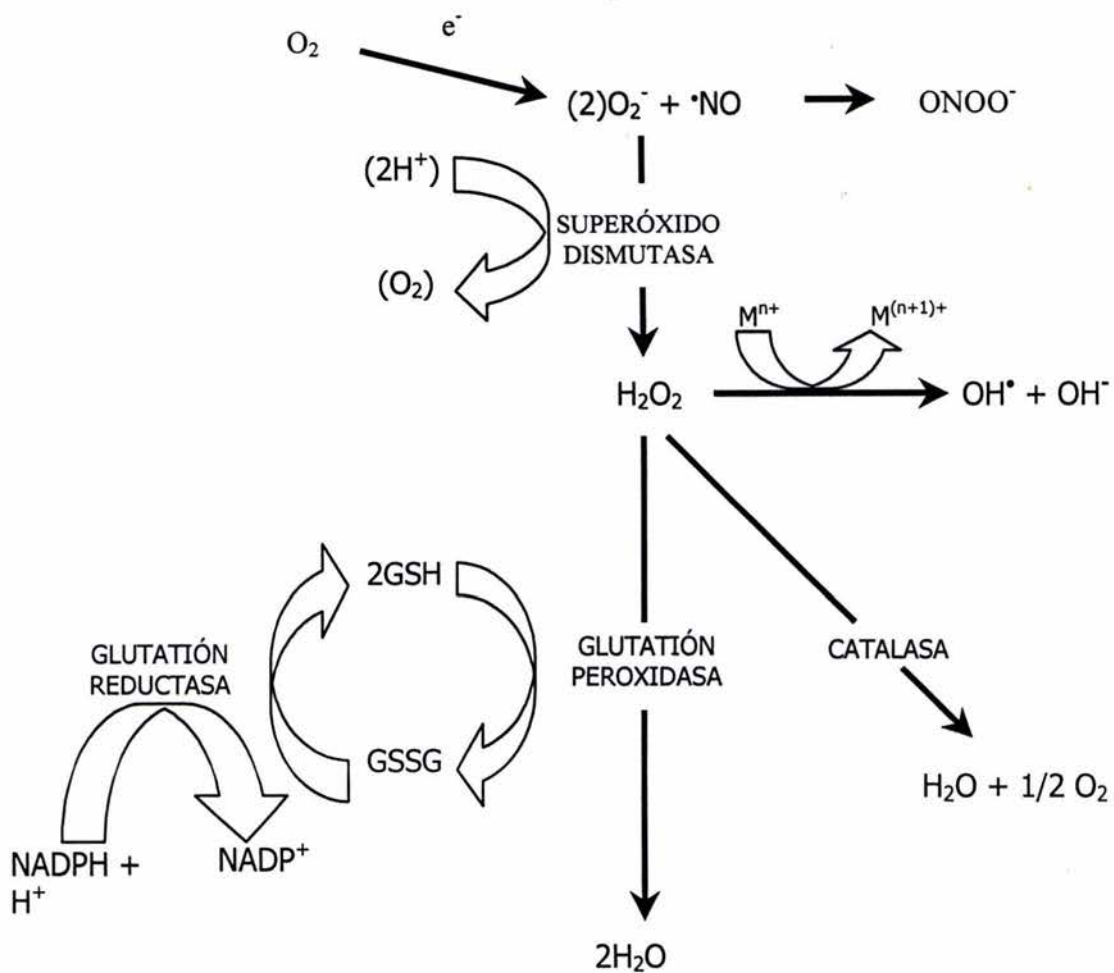
Esta molécula de oxígeno se caracteriza por no tener electrones desapareados, por consiguiente no es realmente un radical; sin embargo, es muy reactivo sobre todo con los lípidos de membranas produciendo radicales peroxilo. Esta molécula se forma después de la absorción de energía cuántica, o bien como resultado de determinadas reacciones químicas, trayendo como resultado el salto de un electrón a un orbital superior y formándose un suborbital con un par de electrones con giros opuestos y un suborbital vacío (Corey et al., 1987; Kahan y Kasha, 1994; Olinescu y Smith, 2002). Un ejemplo de su formación es cuando se iluminan determinados pigmentos en presencia de oxígeno (Huberman, 1995), por ejemplo clorofila, retinal, flavinas y porfirinas. Es importante mencionar que esta molécula tiende a formarse en grandes cantidades en tejidos y órganos sometidos a radiaciones ionizantes terapéuticas (Yu, 1994).

### **3.5. Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )**

El  $\text{ONOO}^-$  no es una especie reactiva de oxígeno, se forma de la reacción entre el superóxido y el óxido nítrico (NO), el cual puede ser precursor de otras especies reactivas. El  $\text{ONOO}^-$  a diferencia del  $\text{OH}^\bullet$  es generado sin la participación catalítica del  $\text{Fe}^{3+}$  (Beckman y Koppenol, 1996). El  $\text{ONOO}^-$  al igual que el  $\text{OH}^\bullet$ , puede inducir daño a todos los componentes celulares. El  $\text{ONOO}^-$  especialmente contribuye a la disfunción de proteínas por nitrosilación de residuos de tirosina (Beckman y Koppenol, 1996).

Existe una variedad de condiciones patológicas en las que se cree que están involucradas las ERO (Halliwell, 1991), como por ejemplo: cáncer, artritis reumatoide, enfermedades respiratorias como fibrosis pulmonar, isquemia-reperfusión y enfermedades mediadas por complejos inmunes (Ha et al., 2000; Janssen et al., 1993). Se tienen evidencias que las ERO juegan un papel muy importante en el origen de algunas enfermedades renales como glomerulonefritis por anticuerpos anti membrana basal (Birtwistle et al., 1989), nefritis nefrotóxica (Rehan et al., 1984), nefropatía crónica por ANP (Kawaguchi et al., 1992; Pedraza-Chaverri et al., 1999; Trachman et al., 1992), síndrome nefrótico de cambios

mínimos, nefropatía por lupus, glomerulonefritis postestreptocócica, nefropatía por IgA (Túri et al., 1997), e IRA (Baliga et al., 1997; Pedraza-Chaverrí et al., 1992).



**Esquema 10.** Enzimas antioxidantes y especies reactivas de oxígeno. M: metal.

### 3.6. ANTIOXIDANTES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Las células poseen sistemas defensivos que les permiten controlar la concentración de las ERO. Estos sistemas son de dos tipos: sistemas antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.

### 3.6.1. SISTEMA ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICO

Son algunos compuestos que poseen la capacidad de interactuar directamente con las especies reactivas de oxígeno; entre estos compuestos están:

1.  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E): es considerado como el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Debido a que es un compuesto hidrofóbico, se encuentra en las membranas biológicas. La vitamina E tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación (reacción 8) en su fase de propagación reaccionando con los radicales lipoperoxilos y los alcoxilos (Burton et al., 1982; Halliwell y Gutteridge, 2001; Ross y Moldeus, 1991).



Al interactuar con lipoperóxidos se genera un radical  $\alpha$ -tocoferilo el cual es reciclado a  $\alpha$ -tocoferol al interactuar con el ácido ascórbico. Además el  $\alpha$ -tocoferol tiene la capacidad de interactuar con el  $^1\text{O}_2$  y en menor grado con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , por lo que se piensa que puede proteger a las membranas de la acción oxidativa de las ERO (Halliwell y Gutteridge, 2001).

2. Ácido ascórbico (Vitamina C): es un compuesto hidrosoluble que se localiza tanto en el citosol de las células como en los fluidos extracelulares y se caracteriza por su capacidad de aceptar electrones. Puede reaccionar directamente con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y el  $\text{OH}^*$  (reacción 9) (Frei et al., 1990; Sauer et al., 2001), generando radical ascorbilo, el cual puede ser reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (reacción 10) (Buettner, 1993; May et al., 1998).



3.  $\beta$ -caroteno (Vitamina A): Es un compuesto liposoluble el cual se encuentra en las membranas lipídicas. Su función antioxidante consiste en reaccionar con el  $^1\text{O}_2$  (reacción 11) y el radical hidroxilo, impidiendo la lipoperoxidación (Krinsky y Deneke, 1982). La interacción con estas ERO genera al radical carotenilo ( $\text{Car}^*$ ) (reacción 12) el cual, a su vez, puede ser reciclado al interactuar con el ácido ascórbico y/o  $\alpha$ -tocoferol (Halliwell y Gutteridge, 2001).



4. Glutatión: Al glutatión reducido es considerado como un compuesto antioxidante ya que impide la oxidación de los grupos -SH de las proteínas. El glutatión reducido tiene la capacidad de reaccionar con las ERO, transfiriéndoles un átomo de hidrógeno (Halliwell y Gutteridge, 2001; Hamdi et al., 1998; Gibson et al., 1985). El glutatión es sustrato de glutatión peroxidasa y de glutatión S transferasa durante la detoxificación de peróxidos orgánicos y en el metabolismo de xenobióticos.

5. Ácido úrico: A pesar de que es un producto final del metabolismo de las purinas en humanos, también posee propiedades antioxidantes; sin embargo, se desconoce el proceso mediante el cual ejerce su acción protectora. Algunos reportes sugieren que el ácido úrico luego de interactuar con el ascorbato, forma complejos con metales de transición tales como el hierro y el cobre (Davies et al., 1986; Sevanian et al., 1985).

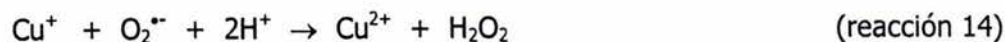
### **3.6.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO**

Existen varias enzimas destinadas a convertir las ERO menos reactivas ( $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en moléculas inocuas, antes de que promuevan la generación de moléculas más reactivas ( $\text{OH}^{\bullet}$  y  $^1\text{O}_2$ ), capaces de reaccionar y dañar las estructuras celulares. Entre las enzimas antioxidantes podemos citar a la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas.

#### **3.6.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)**

Es una metaloenzima que lleva a cabo la reacción de dismutación del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Esquema 10). La SOD es pH independiente y tiene una alta afinidad por su sustrato, es resistente al calor o a compuestos desnaturalizantes como la urea. En los mamíferos, la SOD posee tres isoformas; Cu/Zn-SOD, SOD-EC y Mn-SOD, las tres se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos (Weisiger y Fridovich, 1973) y son productos de genes diferentes. Dos de estas isoformas poseen en su sitio activo Cu y Zn; una de ellas (Cu-Zn-SOD) es un homodímero de 32 kDa que se localiza en el citosol, en el núcleo y en menor cantidad, en el espacio intermembranal de la mitocondria. La otra isoforma de Cu y Zn es un homotetramero de 135 kDa que se localiza extracelularmente en los fluidos como plasma y líquido sinovial (Marklund, 1982; Oury et al., 1996).

El mecanismo catalítico de la Cu/Zn-SOD se basa en el ciclo redox del catión cobre (reacciones 13, 14) (Murphy et al., 1997; Banci et al., 1998).



La tercera isoforma tiene en su sitio activo Mn (Mn-SOD), es una proteína homotetramérica de 80-kDa y se localiza en la matriz mitocondrial (Weisiger y Fridovich, 1973). Su mecanismo catalítico se basa en el ciclo redox del catión manganeso (Fridovich, 1998; Hsieh et al., 1998) (reacción 15, 16).



La tasa de dismutación por actividad de la SOD es  $1 \times 10^4$  veces más rápida que la dismutación espontánea (Fridovich, 1975; Gregory y Fridovich, 1973).

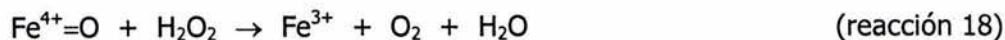
La SOD no es propiamente una enzima detoxificante, ya que el producto de su actividad es el  $\text{H}_2\text{O}_2$  el cual también causa daño celular. Sin embargo, este es solo el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación de las ERO. Se especula que la función de la enzima SOD es la de evitar la formación de  $^1\text{O}_2$  (Corey et al., 1987), mientras que otros autores indican que la actividad de esta enzima está encaminada a impedir la inhibición de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa por parte del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Blum y Fridovich, 1985).

### 3.6.2.2. Catalasa (CAT)

Esta enzima es una hemoproteína tetramérica de aproximadamente 240 kDa y cataliza la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno molecular (Cheng et al., 1981) (Esquema 10).

Esta proteína se localiza principalmente en los peroxisomas, pero también se encuentra en el citoplasma y mitocondrias (Aebi, 1984). El papel antioxidante de la CAT consiste en disminuir el riesgo de la formación del radical hidroxilo por la interacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con metales de transición vía reacción de Fenton (Fridovich, 1999; Halliwell, 1999). Esta enzima es más eficiente cuando hay concentraciones relativamente altas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Su mecanismo catalítico consiste en dos fases: en la primera fase se lleva a cabo el rompimiento de una molécula de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generándose en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de H<sub>2</sub>O (reacción 17); la segunda fase se caracteriza por la reacción de la especie oxoferrilo con otra molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (reacción 18) (Putnam et al., 2000).



Esta enzima une NADPH el cual, según algunos autores, tiene una función dual, por una parte incrementa su eficiencia, y por otra proporciona los electrones necesarios para avanzar a la fase dos del ciclo catalítico cuando los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son bajas (Kirkman y Gaetani, 1984; Kirkman et al., 1999).

### 3.6.2.3. Glutación peroxidasa (GPX)

Esta enzima es una proteína tetramérica que cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de hidroperóxidos protegiendo a los componentes celulares del daño que pudieran generar estos compuestos oxidantes. La GPX es eficiente en la degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando se encuentra en concentraciones relativamente altas. Todas las isoformas de GPX requieren de la presencia de glutación reducido para poder llevar a cabo su función catalítica (Yu, 1994). Hasta la fecha se encuentran caracterizadas cuatro isoformas: la citosólica, la plasmática, la gastrointestinal y la de fosfolípidos.

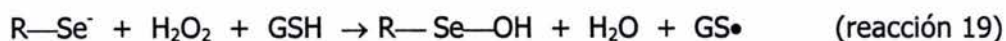
La citosólica (GPXc) es una enzima tetramérica de 84 kDa que solo tiene actividad antioxidante en casos de incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra una baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol (Burk, 1991).

La plasmática (GPXp) es una glicoproteína tetramérica de 100 kDa que, antigénica y estructuralmente, es diferente a las demás isoformas de GPX reportadas. Se sintetiza principalmente en los túbulos proximales del riñón (Avisar et al., 1994a; b; Yoshimura et al., 1991). Actualmente se considera un marcador del daño al túbulo proximal, su actividad plasmática disminuye durante la NTA. La función de esta proteína no está bien establecida ya que el glutación se encuentra en bajas concentraciones en el plasma (0.3 μM) (Avisar et al., 1994b; Yoshimura et al., 1991).

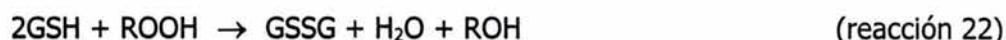
La gastrointestinal (GPXgi) es un tetrámero de 75 kDa, se localiza intracelularmente y se encuentra principalmente en el tracto intestinal de los roedores. En el humano se encontró

en el colon y en el hígado. Esta isoforma tiene una alta afinidad por hidroperóxidos orgánicos (Chu et al., 1993), por lo que se piensa que su función metabólica consiste en proteger al organismo de estos (Brigelius-Flohe et al., 1994).

Para estas 3 isoformas de glutatión peroxidasa se propuso que el anión selenolato es oxidado a ácido selénico, el cual a su vez, es reducido por el glutatión (reacciones 19, 20, 21)(Harris, 1992).

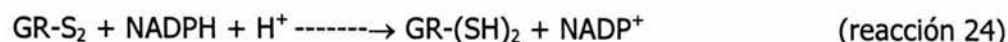


La de fosfolípidos (GPXpl) se encuentra unida a membranas en forma de monómero y reduce hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol. Esta isoforma tiene una menor afinidad que las otras isoformas por el glutatión reducido y su actividad se preserva aún en casos de deficiencia de selenio. Esta isoforma es abundante en testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (Ren et al., 1997). El mecanismo catalítico de esta enzima requiere de la presencia de dos moléculas de glutatión para poder reducir una molécula del hidroperóxido (reacción 22).



#### 3.6.2.4. Glutatión reductasa (GR)

Es una enzima que requiere NADPH y que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) (reacciones 23 y 24).



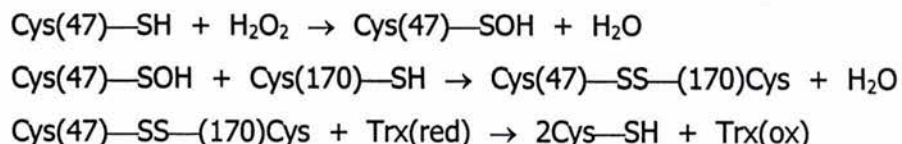
En donde  $\text{GR-(SH)}_2$  y  $\text{GR-S}_2$  corresponden a las formas reducidas (ditiol) y oxidadas (disulfuro) de la GR, respectivamente. Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de glutatión reducido (Harris, 1992).

### 3.6.2.5. Peroxirredoxinas (Prx)

Las Prx son una gran familia de enzimas antioxidantes que son capaces de reducir directamente a los peróxidos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y diferentes alquilhidroperóxidos (Chae et al., 1999a, b). Las Prxs son proteínas diméricas de aproximadamente 23 kDa que contienen residuos de cisteína reactivas en su sitio activo (Cys-47 y Cys-170 en las familias I-V de Prx) y son los responsables de llevar a cabo la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hirotsu et al., 1999). Existen seis familias de genes distintos de Prx (Prx I-VI) en los tejidos de mamíferos (Lee et al., 2001). Estas enzimas (exceptuando a la familia VI) están acopladas al sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa que se encarga de reducir el sitio activo de las Prx una vez que éste se oxida (Kang et al., 1998). Las Prx forman parte del sistema redox que, junto con el sistema del glutatión (glutatión, GR, glutarredoxina y glutatión peroxidasa) controlan el estado redox de los grupos tioles esenciales.

La tiorredoxina reducida es capaz de regenerar la forma reducida de las Prx y la tiorredoxina reductasa tiene la habilidad de regenerar la forma reducida de la tiorredoxina a expensas del NADPH (Mustacich y Powis, 2000). Los miembros de la familia de las Prx que contienen dos residuos de cisteínas conservados (Prx I-V) tienen a la Trx como un donador inmediato de electrones (Chae et al., 1999a, b; Kang et al., 1998; Mustacich y Powis, 2000). Las Prx participan en la protección de las proteínas y lípidos contra el estrés oxidativo, en la proliferación y diferenciación celular y en las vías de señalización intracelular que regulan la apoptosis (Butterfield et al., 1999; Nordberg y Arnér, 2001; Zhou et al., 2000).

Las familias de Prx I, II, IV y VI se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células, mientras que las familias III y V se localizan preferentemente en la mitocondria (Kinnula et al., 2002; Oberley et al., 2001). El mecanismo catalítico propuesto para las Prx I-V es el siguiente (Hirotsu et al., 1999):



### 3.6.2.6. Hemo oxigenasa (HO)

La HO es una proteína localizada en la membrana del retículo endoplásmico que cataliza la conversión del grupo hemo en biliverdina, CO y Fe<sup>3+</sup>, en presencia de oxígeno molecular y NADPH. Un total de 3 O<sub>2</sub> y 6 NADPH son requeridos para degradar una molécula

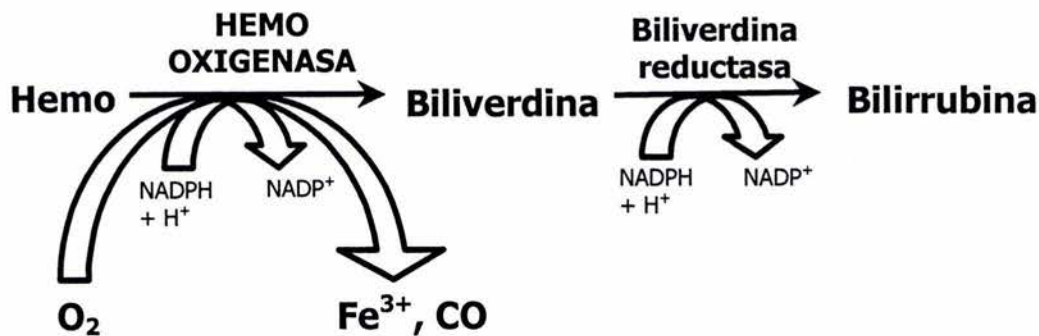


de hemo a biliverdina (Abraham et al., 1988). La biliverdina luego es transformada a bilirrubina por la biliverdina reductasa que se encuentra en el citoplasma (McCoubrey et al., 1995) (Esquema 11). El mecanismo exacto de la HO, que se conoce hasta el momento se muestra en el esquema 11. La HO requiere la actividad concertada de la NADPH-citocromo P450 reductasa (Maines, 1992).

El sustrato natural de esta enzima es el grupo hemo (comercialmente conocido como hemina), el cual es un grupo prostético de diferentes hemoproteínas como la hemoglobina, mioglobina, catalasa, triptófano pirrolasa, citocromo P-450, citocromo b<sub>5</sub>, y citocromos mitocondriales. En humanos, cerca del 80% de la bilirrubina excretada en bilis por día es derivada del grupo hemo de la hemoglobina. El citocromo P-450 es el mayor contribuyente a la bilirrubina derivada de hemo que no proviene de hemoglobina.

El grupo hemo es una metaloporfirina, la protoporfirina de hierro (FePP), muy lipofílico y puede causar daño en diferentes sitios de la célula incluyendo la bicapa lipídica, la mitocondria, el citoesqueleto, el núcleo y varias enzimas intracelulares (Balla et al., 1991; Hebbel y Eaton, 1989; Nath et al., 1998; Vercellotti et al., 1994). Otras metaloporfirinas como la de cobalto son inductores de la HO-1, sin embargo, otras como la de Sn o la de Zn son inhibitoras (DeMatteis et al., 1985; Drummond y Kappas, 1986).

La HO protege a las células de los efectos nocivos del grupo hemo, el cual es el más efectivo promotor de la lipoperoxidación y de la formación de las ERO (Balla et al., 1991; Hebbel y Eaton, 1989; Nath et al., 1998). Adicionalmente se sabe que los productos del metabolismo tienen funciones biológicas importantes. El CO tiene funciones semejantes a las del NO, es decir es una molécula señal para generar GMPc en los sistemas biológicos y es capaz de producir vasodilatación (Maines, 1997). El Fe es capaz de regular genes incluyendo NO sintasa y ferritina (Agarwal et al., 1995; Vogt et al., 1996). La biliverdina inhibe la replicación viral de Herpes y HIV-1 in vitro (Mori et al., 1991). La bilirubina es un potente antioxidante (Llesuy y Tomaro, 1994; Stocker et al., 1987; Yamaguchi et al., 1995; Yu, 1994). La función biológica de esta enzima no solo es formar productos con actividad biológica, sino que es crucial para mantener la homeostasis celular y regular los niveles de hemoproteínas (Maines, 1984; 1992; 1988; Maines y Kappas, 1975).



**Esquema 11.** Metabolismo del grupo hemo a bilirrubina.

### 3.6.2.6.1. Isoformas

Existen 3 isoformas de la HO codificadas por diferentes genes (Cruse y Maines, 1988); una inducible, HO-1, y dos constitutivas, HO-2 y 3 (Maines, 1997; McCoubrey et al., 1997, Maines y Panahiam, 2001). La HO-3 tiene una similitud en secuencia de aminoácidos con la HO-2 del 90% y ambas tienen una distribución semejante en tejidos. La HO-1 y la HO-2 son poco similares en sus secuencias de nucleótidos, composición de aminoácidos, número de transcritos, distribución en tejidos, tipos celulares y regulación (Maines, 1992; 1997; Shibahara et al., 1993). En condiciones normales la cantidad de HO-2 es mucho mayor que HO-1 en todos los tejidos con excepción del bazo (Braggins et al., 1986). Sin embargo, las 3 isoformas son idénticas en su mecanismo de catálisis, especificidad del sustrato, y requerimiento de coenzima (Maines et al., 1998).

La HO-3 tiene un peso molecular de 33,000 (McCoubrey et al., 1997), se describió recientemente y su ARNm se encontró en muchos tejidos incluyendo el riñón (Maines y Panahiam, 2001). Existe evidencia que sugiere que HO-3 es una isoforma específica de rata (Scapaginini et al., 2002).

La HO-2 tiene un peso molecular de 36,000 (Rotenberg y Maines, 1990), se expresa constitutivamente en cerebro, testículo, bazo, riñón, hígado y en tracto gastrointestinal (Dennerly, 2000; McCoubrey et al., 1992; Shibahara et al., 1993; Agarwal y Nick, 2000). Se piensa que la HO-2 puede ser un regulador fisiológico de la función celular y es inducida únicamente por glucocorticoides adrenales (McCoubrey y Maines, 1994; Raju et al., 1997)

La HO-1 se describió en 1968 (Tenhunen et al., 1968) y se purificó de rata (Maines et al., 1977), cerdo (Yoshida et al., 1974), vaca (Yoshida et al., 1982) y humano (Abraham et al.,

1986). La HO-1 también conocida como la proteína de choque térmico HSP32 (Keyse y Tyrrell, 1989), es la más pequeña con un peso molecular de 30,000-33,000 (Shibahara et al., 1985). La HO-1 se localiza en retículo endoplásmico y se distribuye ampliamente, sobre todo se expresa en pulmón, bazo, hígado y riñón (Abraham et al., 1988; Da Silva et al., 2001; Dennery, 2000). La HO-1 juega un papel citoprotector en la modulación de la respuesta del tejido al daño en estados patológicos debido a que es inducible (Wagener et al., 1999). La HO-1 es inducible por un gran número de factores aparentemente no relacionados. Algunos de estos factores ejercen sus efectos por manipulación de los niveles del grupo hemo, mientras que otros factores lo hacen mediante la modificación directa o indirecta de la actividad enzimática o (mediante sustancias que no son grupo hemo) (Abraham et al., 1988).

La inducción de HO-1 se produce por grupo hemo (Maines, 1998; Pimstone et al., 1971; Shibahara et al., 1979; Stocker, 1990), iones de metales pesados como Cr, Co, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Au, Hg, Pb, Cd, Sn, Pt y Sb (Da Silva et al., 2001; Keyse y Tyrrell, 1989; Kikuchi y Yoshida, 1983; Maines y Kappas, 1977), hormonas (Bakken et al., 1972; Veltman y Maines, 1985), endotoxina y toxinas bacterianas (Kikuchi y Yoshida, 1983), fármacos como los aminoglucósidos (Agarwal et al., 1995; Baliga et al., 1999), peróxido; citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Keyse y Tyrrell, 1989), factores de crecimiento (PDGF, TGF- $\beta$ ), hiperoxia; óxido nítrico (NO), donadores de óxido nítrico, dopamina (Dennery, 2000), luz UVA (Keyse y Tyrrell, 1989) y estímulos con un significativo cambio en estado redox de la célula. También aumenta la actividad durante algunas situaciones como en hepatectomía (Solangi et al., 1988), eritropoiesis (Abraham et al., 1983), y durante el envejecimiento (Abraham et al., 1985; Abraham et al., 1987). Además aumenta en diferentes estados patológicos como la anemia (Beck et al., 1982), cáncer (Maines, 1984; Schacter y Kurz, 1986), irradiaciones (Dees et al., 1985), diabetes (Bitar y Weiner, 1984), hipertensión, e IRA (Agarwal et al., 1995; Nath et al., 1992). En general la actividad de la HO-1 aumenta por diversos estímulos que comparten la característica de generar estrés oxidativo. Esto llevó a postular que la inducción de esta enzima es una respuesta antioxidante (Agarwal et al., 1995; Applegate et al., 1991; Keyse y Tyrrell, 1989; Maser et al., 2002; Nath, 1994; Stocker, 1990, Vogt et al., 1996;).

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. IRA Y ESTRÉS OXIDATIVO

Estudios recientes sugieren que las ERO juegan un papel importante en el desarrollo de la IRA (Baud y Ardaillou, 1986; Chatterjee et al., 2000; Heinz, 1983; Nath y Norby, 2000). Las ERO pueden inducir la síntesis de compuestos vasoconstrictores que pueden incrementar la resistencia arteriolar o bien promover la contracción del mesangio, lo que trae como consecuencia una disminución en el proceso de filtración glomerular (Baliga et al., 1999). En los modelos de ciclosporina, glicerol, cisplatino y gentamicina se encontró el aumento de vasoconstrictores por las ERO, lo que ocasiona NTA (Baliga et al., 1999). Las ERO son capaces de generar la peroxidación de los lípidos de membrana alterando la fluidez membranal. También pueden modificar la estructura y, por consiguiente, la actividad de proteínas debido a alteraciones en los residuos de aminoácidos como es el caso de la oxidación de grupos sulfidrilos. Por ejemplo, al generarse un estrés oxidativo con  $\text{FeCl}_3$  en membranas parcialmente purificadas provenientes de médula externa de riñón de cerdo, la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  disminuye y aumenta la formación de sulfidrilos y la peroxidación de las membranas lipídicas (Kako et al., 1988). Por otro lado, las ERO son capaces de desestabilizar las proteínas del citoesqueleto así como a las integrinas, las cuales facilitan la unión a la matriz extracelular (Gailit et al., 1993).

Debido a que se encontró que las ERO se generan en los modelos de IRA por NTA, se realizaron estudios para dilucidar el grado de participación de estas en la generación del daño en esta enfermedad. Utilizando modelos experimentales, se probó la administración de compuestos antioxidantes, el piruvato disminuye la alteración en la actividad de proteínas de membrana como la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en animales con IRA inducida por t-butilhidroperóxido (Clough y Bungler, 1995). Otros compuestos antioxidantes como la riboflavina son capaces de disminuir los efectos nefrotóxicos causados por el cromato (Appenroth et al., 1996b). En el modelo de IRA inducida por gentamicina, la administración de polvo de ajo (el cual posee propiedades antioxidantes intrínsecas) reduce el daño en los túbulos proximales (Pedraza-Chaverrí et al., 2000).

Por otro lado, en modelos de IRA, hay modificaciones en la cantidad y actividad de algunas enzimas antioxidantes. Por ejemplo, en el modelo de isquemia reperusión, las enzimas antioxidantes CAT, GPX y SOD disminuyen su actividad, cantidad de proteína y niveles de ARNm, por lo que se sugiere que las ERO juegan un papel importante en la regulación de

la expresión del sistema enzimático renal (Dobashi et al., 2000; Singh et al., 1993; Yuceyar et al., 1998). En el modelo de IRA por gentamicina se observó una disminución en la actividad de las enzimas CAT, SOD y GPX (Ozbek et al., 2000; Pedraza-Chaverrí et al., 2000). En estudios realizados *in vitro* empleando células renales de embrión de humano, estas fueron sometidas a un estrés oxidativo inducido con cisplatino y se observó que las células que sobreexpresaron a la enzima SOD fueron menos sensibles que aquellas que no fueron transfectadas (Davis et al., 2001).

## **2. NTA MEDIADA POR $K_2Cr_2O_7$**

Al administrar  $K_2Cr_2O_7$  a ratas en dosis únicas de 20 mg/kg de peso, este tóxico es capaz de provocar alteraciones al riñón, afectando particularmente a las células del túbulo proximal (Ruegg et al., 1987), ocasionando en estas células la pérdida de la membrana de borde en cepillo. También provoca que las células se hinchen reduciendo el lumen tubular (Dartsch et al., 1998; Pedraza-Chaverrí et al., 1995b), induce glicosuria, proteinuria y poliuria (De Tata et al., 1998). El máximo contenido de este nefrotóxico en el riñón, se alcanza a las 6 h de exposición y después declina a la mitad del valor máximo a las 48 h (que es el tiempo donde se observa el mayor daño estructural) (Sugiyama, 1992).

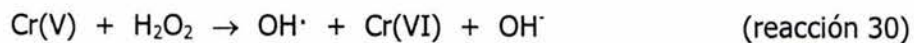
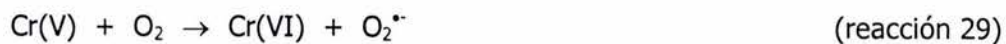
El  $K_2Cr_2O_7$ , de una manera no muy clara, afecta a los transportadores de glucosa en la membrana de borde en cepillo (Miyajira et al., 1983). Asimismo, la presencia en orina de proteínas características de las células del túbulo proximal es un indicativo de alteraciones en las membranas plasmáticas de estas células (Evan y Dail, 1974; Kirschbaum et al., 1981). Entre estas proteínas podemos mencionar a la N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (Elbirt et al., 1998; Pedraza-Chaverrí et al., 1995b), glutamina transaminasa,  $\gamma$ -glutamilttransferasa, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa (Gumbleton y Nicholls, 1998; Hojo y Satomi, 1991).

La aplicación de una dosis única de  $K_2Cr_2O_7$  (15 mg/kg) a ratas, induce un aumento en los niveles de urea en sangre y de creatinina. Asimismo, con ayuda del microscopio electrónico, se determinó que las células epiteliales del túbulo proximal presentaron alteraciones estructurales en las crestas mitocondriales, un aumento en el número de vacuolas y lisosomas (Pedraza-Chaverrí et al., 1995b). Además se detectó presencia de Cr(VI) en vacuolas autolíticas, caracterizadas por la presencia de fosfatasa ácida, en las células del túbulo proximal. Este tipo de vacuolas no se observan en las células normales (Berry et al., 1978).

Sharma et al. (1978) demostraron que el  $K_2Cr_2O_7$  es capaz de provocar, además de necrosis tubular, hemólisis intravascular, la cual puede acelerar el proceso de necrosis y por lo tanto agravar la insuficiencia renal.

### 3. EROS EN LA IRA POR $K_2Cr_2O_7$ .

Una vez que los iones cromato penetran en las células, son reducidos por enzimas como la citocromo P450 y por moléculas reductoras como el glutatión y el ácido ascórbico, generándose otros iones reactivos de cromo así como algunos radicales (Dartsch et al., 1998). Los iones de cromo reactivos generados contienen al cromo con diferente valencia (Cr(V), Cr(IV) y Cr(III)) (Bagchi et al., 1995; Liu y Shi, 2001; Standeven y Wetterhahn, 1989). En presencia de GPX y de NADPH, el Cr(VI) se reduce a Cr(V) ( $Cr(O_2)_4^{3-}$ ) generando  $OH^\bullet$  (Shi y Dalal, 1989; Xie y Zhuang, 2001). Otros estudios indican que el Cr(VI) puede interaccionar con grupos tioles como por ejemplo el del glutatión (Appenroth et al., 1996a; Hojo y Satomi, 1991; O'Brien et al., 1985; Pourahmad y O'Brien, 2001; Sugiyama, 1992) produciendo Cr(V) (reacción 28), el cual es capaz de reducir al oxígeno molecular generando  $O_2^{\bullet-}$  (O'Brien y Kortenkamp, 1994) (reacción 29). El  $O_2^{\bullet-}$  a su vez es reducido por la acción de la SOD, o bien por el proceso de dismutación se produce  $H_2O_2$ , que al interaccionar con el Cr(V) mediante una reacción tipo Fenton se produce la ruptura de la molécula de  $H_2O_2$  generándose el  $OH^\bullet$  (Aiyar et al., 1990; Jones et al., 1991; Liu y Shi, 2001) (reacción 30).



Algunos estudios *in vitro* sugieren que de la reacción anterior puede generarse, además de  $OH^\bullet$ , el  $^1O_2$  con la participación de algunas moléculas de agua (Kawanishi et al., 1986; Sugden y Stearns, 2000).

Xie y Zhuang (2001) observaron que, en cultivos celulares, la generación de  $OH^\bullet$  en células tratadas con Cr(VI) está involucrado en el daño de la membrana plasmática y de los organelos, lo que trae como consecuencia su disfunción.

Algunos antioxidantes como ácido ascórbico, vitamina E, N-acetil cisteína y glutatión previenen el daño renal inducido por  $K_2Cr_2O_7$  (Appenroth y Winnefeld, 1998; Hojo y Satomi, 1991; Na et al., 1992; Standeven y Wetterhahn, 1989; Sugiyama, 1992), mientras que la

inhibición de la biosíntesis de glutatión aumenta el daño renal (Standeven y Wetterhahn, 1989; Sugiyama, 1992).

Por otro lado se sabe que al reaccionar el anión cromato con el glutatión se puede formar Cr(III), el cual es un compuesto inocuo (Hojo y Satomi, 1991).

Además de evidenciar la presencia de las ERO en el daño que induce el cromo hexavalente (Sengupta et al., 1992; Liu y Shi, 2001; Stohs y Bachi, 1995), se demostró indirectamente su presencia, mediante la evaluación de la lipoperoxidación en el riñón (Huang et al., 1999).

#### **4. ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LA IRA POR $K_2Cr_2O_7$**

Existe poca información sobre el comportamiento del sistema enzimático antioxidante en la nefrotoxicidad inducida por el  $K_2Cr_2O_7$ . El único estudio realizado al respecto indica que enzimas antioxidantes tales como la CAT, GPX y SOD son susceptibles de ser modificadas en su actividad. En el estudio realizado por Sengupta et al. (1992) se encontró que a dosis de 1500 mg/kg por día de  $K_2Cr_2O_7$  vía intragástrica, hay una disminución abrupta en la actividad de las enzimas antes mencionadas. El mismo experimento, pero con dosis de 300 mg/kg por día, solo produjo un ligero aumento en la actividad de dichas enzimas. Aunque, en este estudio no se demostró la inducción de la IRA.

#### **5. HO-1 E IRA**

El riñón es un órgano en el cual se demostró la inducción de la HO-1 por diferentes inductores. El inductor por naturaleza de la HO-1, el grupo hemo, también puede causar IRA cuando el riñón se expone a concentraciones relativamente altas de dicho compuesto. Anteriormente se realizó un estudio probar que el riñón era muy sensible al estrés oxidativo y para evaluar la importancia de la inducción de la HO-1. Dicho estudio consistió en establecer un modelo de nefrotoxicidad con glicerol (Nath et al., 1992), en el cual se produce miólisis y hemólisis, aumentando el grupo hemo libre que genera estrés oxidativo. En este estudio se observó el aumento de ARNm de la HO-1 desde las 3 h después de la administración de glicerol y a las 6 h se observó la mayor presencia del mensajero. Tal incremento del mensajero fue acompañado del aumento de la actividad de la HO, medido por el aumento de la producción de bilirrubina y monóxido de carbono. Además se demostró la funcionalidad de la inducción de la HO-1 en dos formas. La primera fue utilizando un inhibidor competitivo de la HO, la protoporfirina de estaño. La administración de este inhibidor aumentó el daño renal,

evaluado por creatinina en suero, comparado con las ratas a las que solo se les administró el glicerol. La segunda estrategia fue inducir a la HO-1 en el riñón y previamente a la administración del glicerol. Se observó protección contra la IRA inducida por glicerol en las ratas a las que se les preindujo la HO-1. En un protocolo semejante pero con una dosis mayor de glicerol, se observó un 100% de mortalidad en las ratas tratadas solo con glicerol. Sin embargo en aquellas a las que se preindujo la HO-1 solo se observó un 14% de mortalidad.

Este potente efecto protector donde se involucra la inducción de la HO-1 también se observó cuando HO-1 es inducida por un estímulo diferente al grupo hemo. Por ejemplo, la previa administración de endotoxina protege contra la IRA inducida por glicerol (Vogt et al., 1995). Esta protección se asoció con la inducción de la HO-1 debido a que se perdió la protección al administrar un inhibidor de la HO. De forma similar la administración de suero nefrotóxico, que es un potente inductor de la HO-1 en túbulos renales, confirió protección contra la IRA inducida por glicerol (Vogt et al., 1996). Estos ejemplos demostraron que la protección observada contra la IRA se originó en la inducción de la HO-1 (Vogt et al., 1995; 1996). Por otro lado, utilizando ratones modificados con deleciones en el gen de la HO-1 (HO-1 -/-) y sometidos a la misma dosis de glicerol que los estudios anteriores, se observó una IRA fulminante con una extensa necrosis tubular y en comparación los ratones HO-1 +/- presentaron una IRA reversible sin presencia de mortalidad (Nath et al., 2000).

En el modelo de nefrotoxicidad por cisplatino, en el cual se está involucrado el estrés oxidativo, la actividad de la HO y el ARNm de la HO-1 aumentan. En este modelo se encontró que aumentó el grupo hemo libre en riñón y que la presencia de HO-1 produjo un efecto vasodilatador que ayudó a disminuir la IRA inducida por el cisplatino. Se sabe que el grupo hemo es capaz de unir al óxido nítrico, el cual es un vasodilatador, generando vasoconstricción. El monóxido de carbono que se libera de actividad de la HO-1 puede ser el responsable del efecto vasodilatador que se observó. Otro mecanismo adicional puede ser el incremento de la ferritina en riñón.

La HO-1 es inducida también en otros modelos de nefropatía como el de gentamicina (Agarwal et al., 1995) y el de cloruro de mercurio (Nath et al., 1996). En ambos casos se sabe que se genera estrés oxidativo y es posible que sea la razón por la cual la HO-1 se induce. Sin embargo en ninguno de los dos modelos se observó que al inhibir a la enzima aumente la creatinina en suero. En el modelo de cloruro de mercurio también se la indujo la HO-1 previo al cloruro de mercurio, pero no se encontró que disminuyera el daño con respecto a las ratas donde solo se administró el cloruro de mercurio (Nath et al., 1996). Sin embargo en otro



estudio al utilizar un dosis mucho menor si lograron observar un ligera disminución de la IRA inducida por cloruro de mercurio al preinducir a la HO-1 (Yoneya et al., 2000).

En el modelo de isquemia reperusión se observó el aumento del ARNm de HO-1 y del contenido del grupo hemo, lo cual puede contribuir a la inducción de la HO-1 (Maines et al., 1993). La inibición de la HO-1 no aumenta el daño renal en todos los modelos de isquemia, por ejemplo en la uninefrectomía con isquemia si se observó el aumento de la creatinina en suero (Shimizu et al., 2000). Esta controversia no se a resuelto aún pero es posible que se deba a los métodos para producir la isquemia.

Mientras la inducción de la HO-1 puede generar un estado de protección en algunos tipos de daño oxidativo (Tabla II), en otros modelos de daño y en ciertas circunstancias, la sobre inducción de la HO-1 puede no modificar o aumentar el daño oxidativo (Nath, 1994). En el caso de no modificarlo se especula sobre la posibilidad de que los productos de la reacción de la HO-1 no ayuda a disminuir el daño. En el caso donde el daño aumenta es posible que se deba a que dichos productos produzcan toxicidad. Por ejemplo, en fibroblastos de hamster que sobreexpresan la HO-1 de 3 a 17 veces, la relativa alta expresión de HO-1 aumenta el daño que produce la toxicidad del oxígeno. Sin embargo cuando se expresa la HO-1 en un menor nivel, es capaz de reducir la toxicidad del oxígeno (Suttner y Dennery, 1999).

Tabla II. Enfermedades renales asociadas a la inducción de HO-1

Enfermedad	Inducción	Significado funcional
IRA		
Rabdomiolisis	+ (Nath et al., 1992)	+ (Nath et al., 1992; 2000)
Nefrotoxinas		
Cisplatino	+ (Agarwal et al., 1995)	+ (Agarwal et al., 1995; Shiraishi et al., 2000)
Gentamicina	+ (Agarwal et al., 1995)	- (Agarwal et al., 1995)
Mercurio	+ (Nath et al., 1996; Yoneya et al., 2000)	+ (Yoneya et al., 2000) - (Nath et al., 1992)
Isquemia-reperfusión	+ (Maines et al., 1993; Shimizu et al., 2000)	+ (Maines et al., 1993; Shimizu et al., 2000) - (Nath et al., 1992; Agarwal et al., 1995)
Endotoxinas	+ (Vogt et al., 1995)	+ (Vogt et al., 1995)
Glomerulonefritis aguda	+ (Vogt et al., 1996; Mosley et al., 1998; Datta et al., 1999)	+ (Vogt et al., 1996; Mosley et al., 1998; Datta et al., 1999)
Enfermedad glomerular		
Nefropatía por IgA	+ (Ohta et al., 2000)	¿?
Cambios mínimos	+ (Ohta et al., 2000)	¿?
Reperfusión por trasplante	+ (Agarwal et al., 1996)	+ (Magee et al., 1999)
Obstrucción uropática	+ (Kawada et al., 1999)	¿?

+: sí; -: no, ¿?: no se conoce

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La inducción de la HO-1 ocurre en varios modelos de daño renal y en algunos de estos puede conferir protección contra el insulto. Los principales efectos que se le atribuyen a la HO-1 son la vasodilatación, la citoprotección y la acción anti-inflamatoria. A pesar de que dichos efectos pudieran disminuir el daño renal no siempre confiere protección debido a la variabilidad en la fuente del daño. Por esta razón es importante el estudio de esta enzima en diversos modelos experimentales de IRA para poder tener un panorama completo del papel que tiene en esta enfermedad.

El modelo de IRA por  $K_2Cr_2O_7$  es adecuado para el estudio de esta enfermedad, ya que se sabe que se forman ERO en la toxicidad por  $K_2Cr_2O_7$  y que dichas especies están involucradas en el daño que se observa en la IRA. Por lo tanto es posible que la HO-1 sea inducida y/o sea relevante su presencia en el riñón durante el curso de la IRA por  $K_2Cr_2O_7$ .

### **IV. HIPÓTESIS**

Si la enzima antioxidante HO-1 aumenta en condiciones de estrés oxidativo y un mecanismo de daño celular en la toxicidad por  $K_2Cr_2O_7$  es el estrés oxidativo entonces aumentará la expresión de la HO-1 en el riñón de ratas con IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$ .

Es posible que la sobre-expresión de la HO-1 con  $SnCl_2$  en riñón, disminuya la IRA y el estrés oxidativo inducidos por  $K_2Cr_2O_7$ .

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Investigar si la HO-1 se induce en un modelo de IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$  y determinar si tiene un papel funcional en este modelo experimental.

Investigar si la sobre-expresión renal de la HO-1 inducida por el  $SnCl_2$  correlaciona con la disminución de la IRA y el estrés oxidativo inducidos por  $K_2Cr_2O_7$ .

## **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Establecer los tiempos que se estudiarán en el modelo de IRA por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas.
- 2.- Evaluar la preinducción de la HO-1 en el modelo de IRA por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas.
  - 2.1- Determinar la expresión renal de la HO-1 mediante un inmunoensayo tipo "western blot" y evaluación de la actividad de HO total.
  - 2.2- Determinar el daño funcional y estructural renal como indicadores de la presencia de la IRA por  $K_2Cr_2O_7$ .
  - 2.3- Determinar el estrés oxidativo mediante marcadores indirectos (proteínas oxidadas y proteínas nitradas) en tejido renal.
- 3.- Evaluar la importancia funcional de la HO-1 en el modelo de IRA por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas, mediante la inhibición de la actividad de la HO-1.
- 4.- Evaluar la inducción de HO-1 al mismo tiempo o después de establecido el daño en el modelo de IRA por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas, mediante la inhibición de la actividad de la HO-1.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

El p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -glucosaminido, la xantina oxidasa, la xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el dietilditiocarbamato (DDC), el glutatión reducido, la glutatión reductasa, el NADPH, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la leupeptina, la pepstatina, la aprotinina, la acrilamida, la hemina, la dinitrofenil hidrazina, el sulfato de estreptomicina, el p-nitrofenol, la bisacrilamida y la glucosa-6-fosfato (G6P) fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El  $K_2Cr_2O_7$ , el  $SnCl_2$  (JT Baker, México) Los anticuerpos que se emplearon en el inmunoensayo tipo "western blot" contra HO-1, Mn-SOD y Cu,Zn-SOD fueron de StressGen (Victoria, BC Canadá) y contra catalasa fueron de Calbiochem (San Diego, CA, EUA). Para las determinaciones del nitrógeno de la urea y la creatinina se emplearán estuches de Farmacéuticos Lakeside (México, D.F.); para la determinación de la lipoperoxidación se usó un estuche de Calbiochem (San Diego, CA, EUA); para la detección el inmunoensayo tipo "western blot" se usó un estuche de quimioluminiscencia de Amersham, Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra).

### 2. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 290-310 g de peso, las cuales se mantuvieron durante todo el tratamiento en jaulas metabólicas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h (6:00 a.m. – 18:00 p.m.). Los animales se mantuvieron con alimentación y agua *ad libitum*, mientras se aclimataban en las jaulas y posteriormente se aparearon por alimentación con el grupo de  $K_2Cr_2O_7$ .

### 3. Diseño experimental

Cada grupo estuvo formado por 5-6 animales, los cuales se pesaron antes y durante cada protocolo. Se recolectó la orina de cada 24 h y los animales se sacrificaron por decapitación, para obtener la sangre y los riñones, luego del correspondiente tiempo de tratamiento con el vehículo o  $K_2Cr_2O_7$ .

La IRA se indujo inyectando  $K_2Cr_2O_7$  subcutáneamente a una dosis de 15 mg/Kg (Pedraza-Chaverrí et al., 1995a), utilizando una solución de 4.5 mg/mL de  $K_2Cr_2O_7$  en solución salina isotónica (SSI). La HO-1 se indujo con  $SnCl_2$  a una dosis de 100 mg/Kg (Da Silva et al., 2001), utilizando una solución de 30 mg/mL de  $SnCl_2$  en SSI. La HO se inhibió con ZnPP a una

dosis de 45  $\mu\text{mol/Kg}$  (Vacharajani et al., 2000), utilizando una solución de 13.5  $\mu\text{mol/mL}$ . La ZnPP se disolvió en NaOH 10 mM, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos pH 7.4 por cada 10 mL de solución y se neutralizó el pH con HCl concentrado.

**a) Curso temporal de la IRA producida por  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .**

**Protocolo 1.** Grupos:

- 1) Control 0 h
- 2)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  12 h
- 3)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  24 h
- 4)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  48 h
- 5)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  120 h

**Protocolo 2.** Grupos:

- |  |   |
|--|---|
| 1) Control 0 h                           | 5) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 8 h  |
| 2) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 2 h | 6) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10 h |
| 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 4 h | 7) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 12 h |
| 4) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 6 h | 8) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 18 h |

El  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  se administró al tiempo 0 y las ratas se sacrificaron según el tiempo correspondiente a su grupo.

**b) Efecto protector del  $\text{SnCl}_2$  en la IRA por  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .**

**Protocolo 3.** Grupos: de 0, 24 y 48 h de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| 1) Control                           | 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + $\text{SnCl}_2$ |
| 2) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ | 4) $\text{SnCl}_2$                                     |

El  $\text{SnCl}_2$  se administró 12 h antes (tiempo -12 h) que el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (tiempo 0) y las ratas se sacrificaron 0, 24 o 48 h después de administrar el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .

**c) Importancia de la HO-1 en la protección del  $\text{SnCl}_2$  en la IRA por  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .**

**Protocolo 4.** Grupos: de 24 h de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

- |   |   |
|---|---|
| 1) Control  | 5) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + ZnPP |
| 2) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$                          | 6) $\text{SnCl}_2$ + ZnPP                   |
| 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + $\text{SnCl}_2$        | 7) $\text{SnCl}_2$                          |
| 4) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + $\text{SnCl}_2$ + ZnPP | 8) ZnPP                                     |

La ZnPP se administró 18 h antes (tiempo -18 h) que el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , el  $\text{SnCl}_2$  se administró 12 h antes (tiempo -12 h) que el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  se administró en el tiempo 0. En los tiempos donde no se debía administrar algún compuesto a las ratas se les inyectó SSI y se sacrificaron 24 h después de administrar el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .

**d) Efecto del  $\text{SnCl}_2$  administrado al mismo tiempo o 12 h después que el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .**

**Protocolo 5.** Grupos: de 24 h de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

- |   |  |
|---|--|
| 1) Control  | 4) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + $\text{SnCl}_2$ -12 |
| 2) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$                      | 5) $\text{SnCl}_2$ -0                                      |
| 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ + $\text{SnCl}_2$ -0 | 7) $\text{SnCl}_2$ -12                                     |

El  $K_2Cr_2O_7$  se administró al tiempo 0 y el  $SnCl_2$  se administró al mismo tiempo o 12 h después que el  $K_2Cr_2O_7$ . En los tiempos donde no se debía administrar algún compuesto a las ratas se les inyectó SSI y se sacrificaron 24 h después de administrar el  $K_2Cr_2O_7$ .

#### **4. Muestras**

**4.1. Orina:** La orina se centrifugó a  $3,000 \times g$  durante 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga IEC HN-SII. Se hicieron alícuotas de 1.5 ml en tubos eppendorf y se congelaron a  $-45^\circ C$  para su uso posterior.

**4.2. Suero:** Al momento del sacrificio, la sangre de las ratas se colectó de manera individual en tubos de vidrio, después de un tiempo se separó el coágulo, se centrifugaron las muestras a  $3,000 \times g$  durante 10 min a temperatura ambiente, el suero se alicuotó en tubos eppendorf y se congelaron a  $-45^\circ C$  hasta su uso.

**4.3. Riñón:** Los riñones de cada una de las ratas fueron disectados, se cortaron transversalmente en 5 secciones y se colocaron en papel aluminio para guardarlas inmediatamente a  $-70^\circ C$ .

**4.4. Microsomas:** Se preparó una fracción microsomal por centrifugación diferencial de un homogenado de riñón en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 empleando un homogenador tipo politrón Brinkman durante 10 seg. Se utilizó una dilución de tejido en amortiguador de 1:10 (p/v). Los homogenados se centrifugaron en una microcentrífuga Beckman a  $5,000 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ C$ . El sobrenadante se separó, se colocó en tubo nuevo y se centrifugó a  $12,000 \times g$  durante 20 min a  $4^\circ C$ . El sobrenadante se separó y se colocó en tubos para ultracentrífuga y se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman optima TLX a  $150,000 \times g$  durante 1 h a  $4^\circ C$ . El sobrenadante se desechó y el precipitado formado se resuspendió en un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 complementado con  $MgCl_2$  2 mM (Maines, 1984).

**4.5. Homogenado:** Se preparó el homogenado de riñón completo en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, tritón 1%, empleando un homogenador tipo politrón Brinkman durante 10 seg. Se utilizó una dilución de tejido en amortiguador de 1:10 (p/v). Los homogenados se centrifugaron en una microcentrífuga Beckman a  $15,000 \times g$  durante 1 h a  $4^\circ C$ .

**4.6. Homogenado con inhibidores de proteasas:** Se preparó de la forma antes mencionada, utilizando una dilución 1:4 y un cóctel de inhibidores de proteasas (leupeptina 5  $\mu g/ml$ , pepstatina 7  $\mu g/ml$  y aprotonina 5  $\mu g/ml$ ) y EDTA 1 mM.

**4.7. Cuantificación de proteínas.** Esta determinación se realizó por el método colorimétrico de Lowry et al. (1951).

**4.8. Cortes histológicos:** Un corte transversal de riñón se fijó en 1 ml de formol al 10% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) por 24 h y posteriormente se deshidrataron con 3 lavados de etanol absoluto de 1 h cada uno. Posteriormente, se trataron con 3 lavados de xilol y luego con 3 lavados de parafina fundida a 60°C. Las muestras se colocaron por separado en moldes para su inclusión en parafina. Una vez fría la parafina el bloque se desmoldó y se procedió a realizar cortes de 4  $\mu\text{m}$  con un microtomo de rotación Leica RM 2145. Previamente se prepararon portaobjetos esmerilados con una solución de  $\gamma$ -metacrilixipropiltrimetoxisilano al 5% en acetona. Se sumergieron 5 min en dicha solución y se dejaron secar por 12 h. Los cortes se colocaron en los portaobjetos silanizados y se incubaron por 15 min a 60°C. Al finalizar este tiempo de incubación las muestras están listas para realizar una tinción de hematoxilina y eosina (H&E) o una inmunohistoquímica (ver secciones correspondientes).

## **5. Evaluación del daño renal**

### **5.1. Daño tubular**

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

Se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de orina sin diluir, se agregaron a 375  $\mu\text{L}$  de un amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.4 y posteriormente se les adicionaron 125  $\mu\text{L}$  de sustrato p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucosaminido 30 mM (Jung et al., 1991). Para evaluar la absorción basal de cada muestra se preparó un blanco sin sustrato y para evaluar la conversión espontánea del sustrato se preparó un blanco sin muestra de orina. Todos los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C durante 15 min. La reacción se detuvo con 1.1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M, pH 10.4 y las muestras se leyeron a 405 nm. Las absorbencias de la forma aniónica del p-nitrofenol se interpolaron en una curva de calibración de p-nitrofenol en un intervalo de 5 a 175 nmol. Los resultados se expresaron como unidades (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo.

La excreción urinaria de enzimas lisosomales como la NAG, es empleada como un indicador del daño en el túbulo proximal (Lockwood y Bosmann, 1979).



**5.1.2. Cuantificación de proteínas en la orina.** La concentración de proteínas totales eliminadas en la orina se determinó por medio de su precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y la medición de la turbidez a 420 nm (Pedraza-Chaverrí et al., 1999). Para ello las orinas se diluyeron 1:5 con solución salina (volumen final 2 ml), posteriormente las muestras se separaron en dos alícuotas de 1 ml; a una se le agregaron 250  $\mu$ L de TCA al 12.5% y a la otra 250  $\mu$ L de solución salina ya que esta última se utilizó como blanco de cada muestra. Todos los tubos se dejaron incubando durante 10 min a temperatura ambiente. Para la determinación de la concentración, los resultados de absorbencias se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) entre 0.04 y 0.8 mg/ml. Los resultados se expresaron en mg de proteína/24 h.

El aumento en la excreción urinaria de proteína refleja daño glomerular o tubular (Pedraza-Chaverrí et al., 1995a).

**5.1.3. Tinción de H&E.** Los cortes histológicos se desparafinaron con 3 lavados de 5 min de xilol y se rehidrataron con 3 lavados de 5 min de alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Se tiñeron los tejidos con hematoxilina durante 5 min, se lavaron con agua y con una solución de HCl 1% en etanol al 70%. Luego se viró la hematoxilina con  $\text{LiCO}_3$  al 0.1% y se tiñeron con eosina durante 15 seg y se lavaron con lavados breves de etanol absoluto. Finalmente, los cortes ya teñidos se deshidrataron pasándolos por soluciones de etanol y xilol; se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos. Esta tinción se realiza para observar las estructuras del tejido, la hematoxilina tiñe de morado los núcleos y la eosina tiñe el citoplasma y membranas de rosa.

**5.1.4. Análisis histológico.** Los cortes teñidos con H&E se analizaron con un microscopio de luz Leica con un lente de 20X y la cuantificación del daño histológico se determinó usando un analizador de imágenes de Leica Qwin (Cambridge, Inglaterra). Se realizó el perfil histológico de 50 túbulos proximales por rata, seleccionados al azar (5 ratas por grupo experimental). Para ello, se cuantificaron los túbulos dañados, células dañadas por túbulo, el área dañada por célula y el área celular total ( $\mu\text{m}^2$ ). El daño se identificó por la presencia de signos de necrosis como la inflamación, vacuolas y detritus. Se calculó el porcentaje de túbulos dañados, de células dañadas por túbulo, el área tubular dañada por célula y el promedio de área celular total.

## **5.2. Función glomerular**

**5.2.1. Creatinina en suero.** La creatinina presente en suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé, basado en la generación de un complejo anaranjado al reaccionar la creatinina con el ácido pícrico en solución alcalina. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbancia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra.

El suero se desproteinizó previamente por precipitación con TCA al 1.25%, posteriormente las muestras se centrifugaron 10 min a 3,000 x g en una microcentrífuga Beckman. En una celda se adicionaron 50 µL del suero desproteinizado y 500 µL de la mezcla de reacción (ácido pícrico 17.5 mM e hidróxido de sodio 0.29 M, 1:1), se leyó en el espectro a los 0, 30, 60 y 90 seg. Antes de leer las muestras se ajustó la lectura a cero con un blanco con agua, posteriormente se leyó el estándar de creatinina de 2 mg/dL a los tiempos antes mencionados. La cantidad de creatinina presente en las muestras se obtuvo calculando el cociente de las diferencias de densidad óptica de la muestra (la lectura de 90 seg menos la lectura de 30 seg) entre el estándar por la concentración del estándar. Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dL.

**5.2.2. Depuración de creatinina.** Para ello fue necesario cuantificar la concentración urinaria y en suero de creatinina. Se calculó la depuración de la creatinina usando la siguiente fórmula: depuración de creatinina =  $(UCREA \cdot VU) / (PCREA \cdot 1440)$ . Donde UCREA es la concentración de creatinina en la orina, expresada en mg/dl; VU es el volumen urinario de 24 h, expresado en ml; PCREA es la concentración de creatinina en el plasma sanguíneo, expresada en mg/dl, y 1440 son los minutos que hay en 24 h. La depuración de la creatinina se expresó en ml/min.

La depuración de la creatinina se emplea como un marcador para evaluar la función renal, ya que es una manera de medir la velocidad de filtración glomerular (Pedraza-Chaverrí et al., 1999).

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

Se mezclaron 10 µL de la muestra con 400 µL de ortoftalaldehído 4.8 mM y 400 µL de borato 87 mM, los tubos se incubaron a 37°C por 15 min; transcurrido ese tiempo se leyeron las absorbancias. En las mismas condiciones se incluyó un blanco con agua y un estándar de

urea de 50 mg/dL. La concentración de urea en el suero se obtuvo dividiendo la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y el resultado se multiplicó por la concentración del estándar de urea. La cantidad de nitrógeno de la urea se calculó dividiendo la concentración urea entre 2.14, factor que nos indica el número de átomos de nitrógeno en una molécula de urea. Los resultados se expresan en mg/dL.

Un aumento en los niveles circulantes de nitrógeno de urea, puede ser consecuencia de una disminución en la velocidad de filtración glomerular (Pedraza-Chaverrí et al., 1999).

## **6. Evaluación de la expresión de las enzimas antioxidantes en el riñón**

### **6.1. Actividad de enzimas**

**6.1.1. Actividad de la hemo oxigenasa (HO).** La actividad de HO se determinó en microsomas por la bilirrubina generada (Agarwal et al., 1995; Da Silva et al., 2001). Se colocaron por separado y en tubos eppendorf, 75 y 150  $\mu\text{g}$  de proteína total de microsomas ajustándolos a 175  $\mu\text{L}$  con amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 complementado con  $\text{MgCl}_2$  2 mM. Se utilizaron como blanco muestras que se calentaron a 85°C por 5 min para desnaturalizar a la enzima. Se preparó una mezcla de reacción que contenía citosol de hígado de ratón 0.5X, como fuente de biliverdina reductasa, hemina 100  $\mu\text{M}$ , G6P 5 mM, y G6PDH 4 U/ml. Se adicionó a los microsomas diluidos 50  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción y 25  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -NADPH 8 mM. La reacción se incubó durante 2 h a 37°C en oscuridad, para no descomponer la bilirrubina formada. Se detuvo con la adición de 0.5 ml de cloroformo y se mezcló de inmediato para extraer la bilirrubina formada. Los tubos se centrifugaron a 12,000  $\times$  g por 1 min. Se tomó la fase orgánica con una pipeta Pasteur y las muestras se leyeron realizando un barrido de 450 a 550 nm para registrar la absorción de la muestra.

Se calculó la absorbancia de bilirrubina formada restando la densidad óptica a 464 nm de la densidad óptica a 530 nm ( $\Delta\text{DO}$ ). La actividad se calculó con la diferencia de  $\Delta\text{DO}_{\text{muestra}}$  menos  $\Delta\text{DO}_{\text{blanco}}$  entre el producto del coeficiente de extinción ( $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por la cantidad de microsomas en mg y se divide entre el tiempo de incubación de la reacción. Los resultados se expresaron como pmol/mg proteína/h.

### **6.1.2. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)**

**6.1.2.1. SOD total.** La actividad de la SOD total se determinó por la reducción del azul de NBT (Oberley y Spitz, 1984). Se preparó una solución de xantina oxidasa con una

concentración de 168 U/L y una mezcla de reacción que contenía en concentración final: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6  $\mu$ M, albúmina sérica bovina 0.006% y carbonato de sodio 49 mM. Se colocaron 2.45 ml de la mezcla de reacción en dos tubos de ensayo y se mantuvieron a 27°C. Posteriormente se adicionaron 0.5 ml del homogenado renal diluido 1:100 con agua e inmediatamente después la reacción se inició con la adición de 50  $\mu$ L de la solución de xantina oxidasa. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero en lugar de la solución de xantina oxidasa se adicionó agua. De manera simultánea se preparó un blanco de comparación el cual contenía xantina oxidasa pero sin el homogenado. Todos los tubos se incubaron 30 min, al término de esta incubación se adicionó 1 ml de cloruro cúprico 0.8 mM y se leyó la densidad óptica a 560 nm. Los datos se expresaron como U de SOD/mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

**6.1.2.2. SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD).** Los homogenados renales se incubaron previamente con DDC 50 mM durante 1 h a 30°C (100  $\mu$ L de homogenado + 100  $\mu$ L de DDC 100 mM) para inactivar la isoforma Cu,Zn-SOD. Posteriormente, el homogeneizado tratado con el DDC se dializó 3 veces durante 1 h (cada vez) en 400 volúmenes de amortiguador de fosfatos 5 mM-EDTA 0.1 mM pH 7.8 (Iqbal y Whitney, 1991). Para determinar la actividad de la Mn-SOD, se siguió el mismo procedimiento que para la actividad de SOD total, sólo que los homogeneizados tratados como se mencionó antes, se diluyeron 1:50 con agua. Los datos se expresaron como U de SOD/mg de proteína.

**6.1.2.3. SOD dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD).** La actividad de la Cu,Zn-SOD se obtuvo restando la actividad de la Mn-SOD de la actividad de la SOD total. Los resultados se expresaron como U de SOD/mg de proteína.

**6.1.3. Actividad de la catalasa (CAT).** Para esta determinación se usó el método de Aebi (1984). En una celdilla de cuarzo se adicionaron 25  $\mu$ L del homogenado diluido 1:30 en amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.0. Se mezcló con 725  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 7.7 mM en amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.0. Se midió el cambio de absorbancia a 240 nm cada 15 seg durante 30 seg, que es el período en que la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sigue una cinética de primer orden (Aebi, 1984). De acuerdo a Aebi (1984), se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula:  $k = (1/t)(2.3 \times \log A1/[A2])$  donde t = intervalo de tiempo medido, A1 y A2 son las absorbancias del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tiempos t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>.

#### **6.1.4. Actividad de la GPX**

Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976). El homogenado se diluyó 1:10 (con amortiguador de fosfatos) y 100  $\mu$ L de esta dilución se mezclaron con 800  $\mu$ L de la siguiente solución: fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 unidad de glutatión reductasa/ml y glutatión reducido 1 mM. Se preparó un blanco con la muestra de reacción añadiendo agua destilada y no el sobrenadante del homogenado. Después de 5 min de incubación de la muestra con el amortiguador a temperatura ambiente, se agregaron 0.1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.25 mM a cada muestra e inmediatamente después se leyó la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 3 min. Los datos se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad se define como los  $\mu$ moles de NADPH oxidado en un minuto.

#### **6.1.5. Actividad de la GR**

La actividad de esta enzima se determinó en el homogenado de corteza renal por medio de una reacción cinética en la cual la enzima convierte el GSSG a GSH en presencia de NADPH como cofactor. La reacción se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm del NADPH que absorbe (Carlberg y Mannervik, 1975). En un tubo se mezclaron 50  $\mu$ L del homogenado previamente diluido 1:5 en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6, con 950  $\mu$ L de la mezcla de reacción la cual contenía EDTA 0.5 mM, GSSG 1.25 mM y NADPH 0.1 mM. La mezcla se adicionó a una celda de cuarzo y se leyó cada minuto durante 3 min, utilizando como blanco amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6. Los resultados se expresaron en U/mg proteína en donde una unidad = 1  $\mu$ mol de NADPH oxidado/min.

### **6.2. Cantidad de enzimas**

**6.2.1. Inmunoensayo tipo "western blot".** Se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total del homogenado con inhibidores de proteasas o 60  $\mu$ g de microsomas para realizar electroforesis desnaturizantes en gel de acrilamida (PAGE-SDS) según el método de Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando una cámara de electroforesis Mighty Small™ SE 250 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, EUA) durante 1.5 h a 100 mV. Las proteínas separadas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de Hybond ECL, Amersham, Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra) con una cámara de transferencia Mighty Small™ TE 22 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, EUA) durante 1 h a 400 mA a 4°C.

Para el inmunoensayo tipo "western blot" las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5% (Svelty) en fosfato de sodio dibásico 80 mM, fosfato de sodio monobásico 20 mM, NaCl 100 mM y Tween-20 al 0.1 % (PBS-T) pH 7.4 durante 1 h, a temperatura ambiente y con

agitación. Después se realizaron dos lavados de 20 min con PBS-T, las membranas con proteínas de homogenado se incubaron con agitación durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos comerciales anticatalasa (1:1000), anti-Cu,Zn-SOD (1:1000) y anti-Mn-SOD (1:1000). Las membranas con proteínas microsomales se incubaron con agitación durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo comercial anti-HO-1. Después de dos lavados de 20 min con PBS-T, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano diluido 1:5,000 durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces más con PBS-T durante 20 min. Los anticuerpos unidos a las membranas se observaron usando un sistema de detección por quimioluminiscencia (Bio Rad, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Pedraza-Chaverri et al., 2000). Las membranas se expusieron por 3 min a una placa para radiografía Hyperfilm y luego se hizo el revelado de la placa.

Finalmente se realizó una densitometría a cada una de las placas obtenidas utilizando un programa (Sigma Scan Pro 4.0, San Rafael, EUA) y los resultados obtenidos se expresarán como porcentaje, considerando como el 100% el promedio de las muestras de los grupos control.

**6.2.2. Inmunohistoquímica de HO-1.** A partir de cortes de riñón previamente desparafinados e hidratados, se incubó con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4.5% en metanol durante 1.5 h para inhibir la peroxidasa endógena y luego se bloquearon los tejidos con albúmina sérica bovina al 3% por 30 min. Los tejidos se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-HO-1 hecho en conejo, diluido 1:500 en albúmina sérica bovina al 1%, durante toda la noche. Los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron por 1 h con un anticuerpo secundario anti-Ig de conejo conjugado con peroxidasa. Se utilizó una dilución 1:700 y al final de la incubación se lavaron los tejidos. Se reveló con 3,3'-diaminobencidina y los tejidos se contrastaron con hematoxilina. Los cortes se deshidrataron pasándolos por soluciones de etanol y xilol y se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos. La reacción positiva se hizo evidente por una tinción café.

## **7. Evaluación del estrés oxidativo**

**7.1. Contenido de carbonilos en proteínas.** La 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) reacciona con los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas presentes en las muestras para formar un complejo proteína-hidrazona (Reznick and Packer, 1994) el cual absorbe a 370 nm.

El contenido de carbonilos en las proteínas oxidadas se determinó en 300  $\mu\text{L}$  de los homogenados con inhibidores de proteasas, los cuales se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de sulfato de estreptomicina al 10% durante la noche para eliminar los ácidos nucleicos. Al día siguiente se centrifugaron y se tomaron 2 alícuotas de 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se colocaron en tubos eppendorf; a uno de los tubos se le agregó 600  $\mu\text{L}$  de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM disuelta en HCl 2.5 M y el otro tubo se preparó para determinar el contenido de proteínas totales en el homogenado agregándole 600  $\mu\text{L}$  de HCl 2.5 M. Una vez adicionados la DNPH y el HCl, las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad agitándolas cada 15 min. A continuación las muestras fueron precipitadas con 600  $\mu\text{L}$  TCA al 10% con la finalidad de precipitar las proteínas y lavar, centrifugando posteriormente durante 10 min a 4,000  $\times$  g y 4°C. Los lípidos y la DNPH libre se extrajeron con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1). Los precipitados se resuspendieron en 1 ml de guanidina-HCl 6 M y finalmente se leyeron a 370 nm.

El contenido de carbonilos, que expresa la cantidad de proteínas oxidadas, se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar del DNPH ( $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y el dato de la concentración total de proteínas determinada a 280 nm en los tubos sin DNPH. Los resultados se expresan como nmoles de carbonilos/mg de proteína. El contenido de grupos carbonilo en las proteínas es usado como un marcador de daño oxidativo ya que los radicales libres de oxígeno llevan a la formación de derivados carbonílicos, porque atacan a las proteínas en ciertos aminoácidos (arginina, prolina o lisina) (Reznick y Packer, 1994).

**7.2. Inmunohistoquímica de nitrotirosina.** La nitrotirosina se utiliza como marcador de estrés oxidativo porque es una modificación de los residuos de tirosina de proteínas, debida al radical peroxinitrito que se forma a partir de la reacción del anión superóxido y el óxido nítrico (MacMillan-Crow y Thompson, 1999). La inmunohistoquímica se realizó en cortes de riñón. Se utilizó el mismo procedimiento que en la inmunohistoquímica de HO-1, pero se ocupó un anticuerpo primario anti-nitrotirosina hecho en conejo y diluido 1:700.

**8. Análisis estadístico.** Los datos se presentaron como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.). Los datos se analizaron con el programa Prism 3.02 (Graph Pad, San Diego, EUA) mediante ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett, Bonferroni o mediante una prueba de t de Student no pareada, según el tipo de datos. Un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

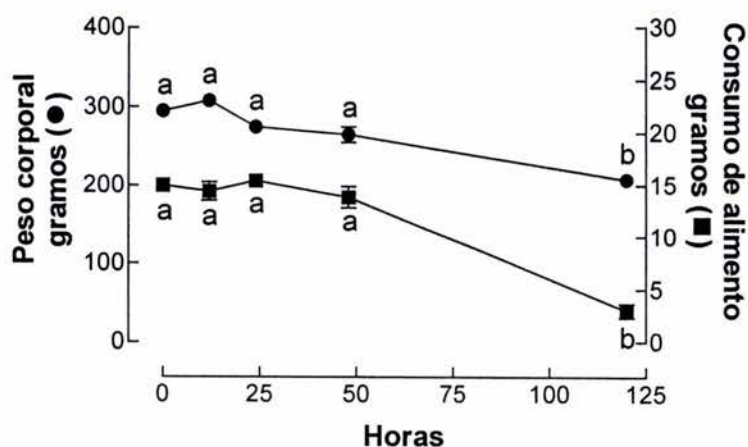
## VIII. RESULTADOS

### 1. Curso temporal de la IRA producida por $K_2Cr_2O_7$

La IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas se realizó como se menciona en la metodología. Se evaluaron varios tiempos luego de la administración del  $K_2Cr_2O_7$  para determinar los tiempos que se utilizarían para experimentos posteriores.

#### 1.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario

El peso corporal de los animales presentó una tendencia a disminuir a medida que transcurrió el tiempo (Fig. 1). Pero solo se encontró diferencia estadística ( $P < 0.001$ ) a las 120 h de tratamiento. Se cuantificó el consumo diario de alimento de las ratas para determinar si la disminución en el peso se debía a la disminución del consumo de alimento. Se encontró que al inicio del experimento (antes de la inyección de  $K_2Cr_2O_7$ ) consumían en promedio 14 g por día y después de 120 h de haber administrado el  $K_2Cr_2O_7$  su consumo disminuyó hasta 2 g por día.



**Figura 1.** Curso temporal del peso corporal (●) y el consumo de alimento (■) de ratas en la IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$ , promedio  $\pm$  error estándar de la media (Prom $\pm$ E.E.M), n=5-25. Grupos con diferentes letras indica diferencia contra el control al tiempo 0.  $P < 0.001$ .



El volumen urinario de las ratas fue de  $13.1 \pm 1.5$ ,  $14.4 \pm 3.1$ ,  $14.3 \pm 5.7$ ,  $19.6 \pm 1.7$ ,  $23.6 \pm 2.1$ ,  $20.3 \pm 1.6$  y  $15.4 \pm 3.7$  ml a las 0, 12, 24, 48, 70, 96 y 120 h de tratamiento con el  $K_2Cr_2O_7$ . Se determinó un aumento significativo a las 48, 70, 96 y 120 h con respecto al control ( $P < 0.05$ ).

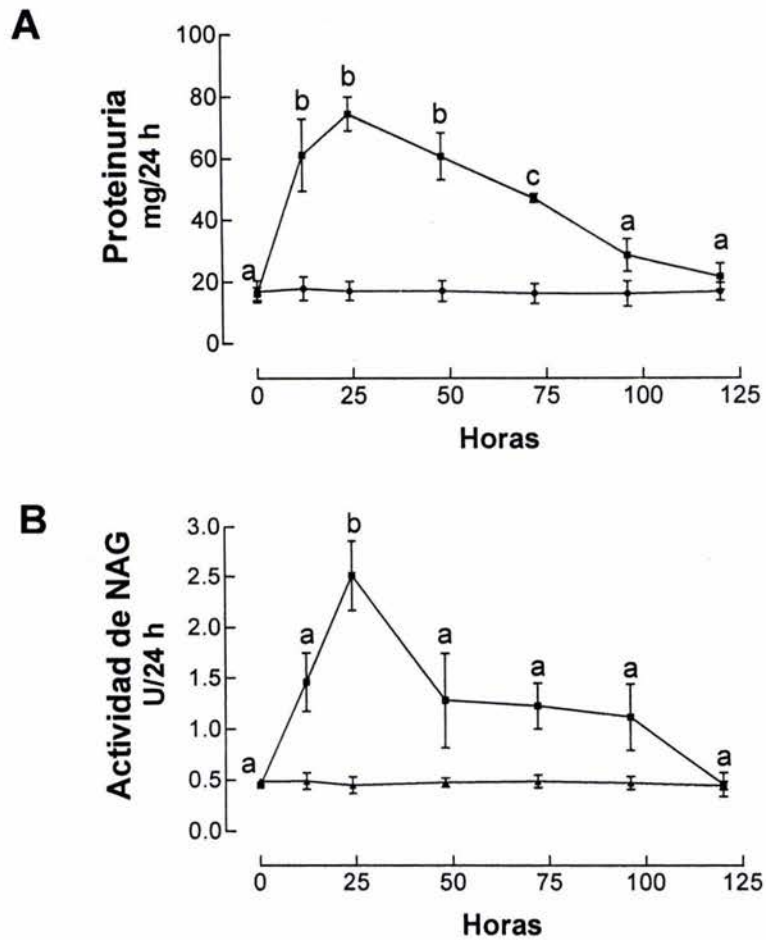
## **1.2. Función tubular**

Se determinó la proteinuria y la actividad de NAG en orina durante el curso de la IRA. En ambos parámetros se encontró un pico de daño a las 24 h. La proteinuria aumentó 2.6 veces a las 24 h (Fig. 2A) y la actividad de NAG aumentó 4 veces con respecto a los valores normales (Fig. 2B). Luego de este pico de daño se observa una disminución gradual en la proteinuria hasta alcanzar valores similares al control. En cambio el aumento observado en la actividad de NAG solo fue significativo a las 24 h.

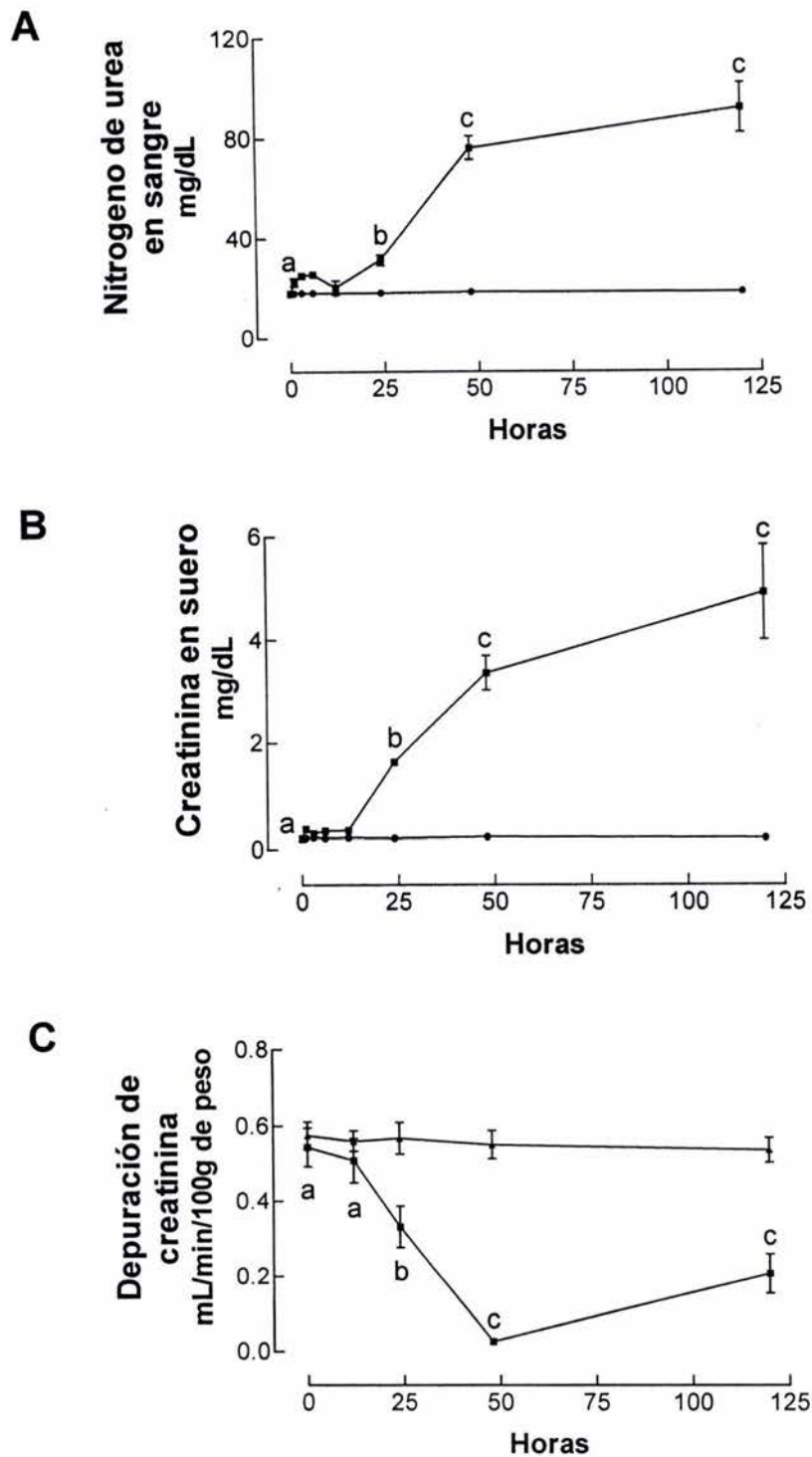
## **1.3. Función glomerular**

Se determinaron como marcadores de daño glomerular BUN, creatinina en suero y depuración de creatinina. La concentración de BUN y creatinina en suero presentaron el mismo comportamiento entre ellos a través del tiempo (Fig. 3A y 3B) es decir van en aumento a partir de las 24 h. La concentración de BUN aumentó 3 veces a las 48 h y 6 veces a las 120 h, con respecto al tiempo cero. La creatinina aumentó 7 veces a las 48 h y 9 veces a las 120 h con respecto al tiempo cero. En ambos casos no se observó disminución del daño en los tiempos estudiados.

La depuración de creatinina se corrigió por peso corporal debido a que los animales perdieron peso. La depuración de creatinina en los animales expuestos a  $K_2Cr_2O_7$  disminuyó gradualmente hasta un mínimo a las 48 h (20 veces menos que el control) (Fig. 3C) y a las 120 h la depuración presenta una tendencia a aumentar.



**Figura 2.** Curso temporal de la proteinuria (**A**) y la actividad de N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) (**B**) en la IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$ . Prom $\pm$ E.E.M. n=5-35. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.05.



**Figura 3.** Curso temporal de la concentración sanguínea de nitrógeno de urea (BUN) (A), la concentración de creatinina en suero (B) y la depuración de creatinina (C) en la IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$ . Prom $\pm$ E.E.M. n=4-5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.

#### **1.4. Expresión de HO-1**

Se determinó la expresión de HO-1 por "western blot" e inmunohistoquímica en ratas tratadas con  $K_2Cr_2O_7$  y sacrificadas a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 18 h después de la inyección de  $K_2Cr_2O_7$ . Se observó inducción de la enzima desde las 2 h y esta se localizó cerca del borde de la luz de las células epiteliales del túbulo (Fig. 4). A las 6 h se observó el mayor número de túbulos con expresión de HO-1 (Fig. 5).

### **2. Efecto protector del cloruro de estaño ( $SnCl_2$ ) en la IRA por $K_2Cr_2O_7$**

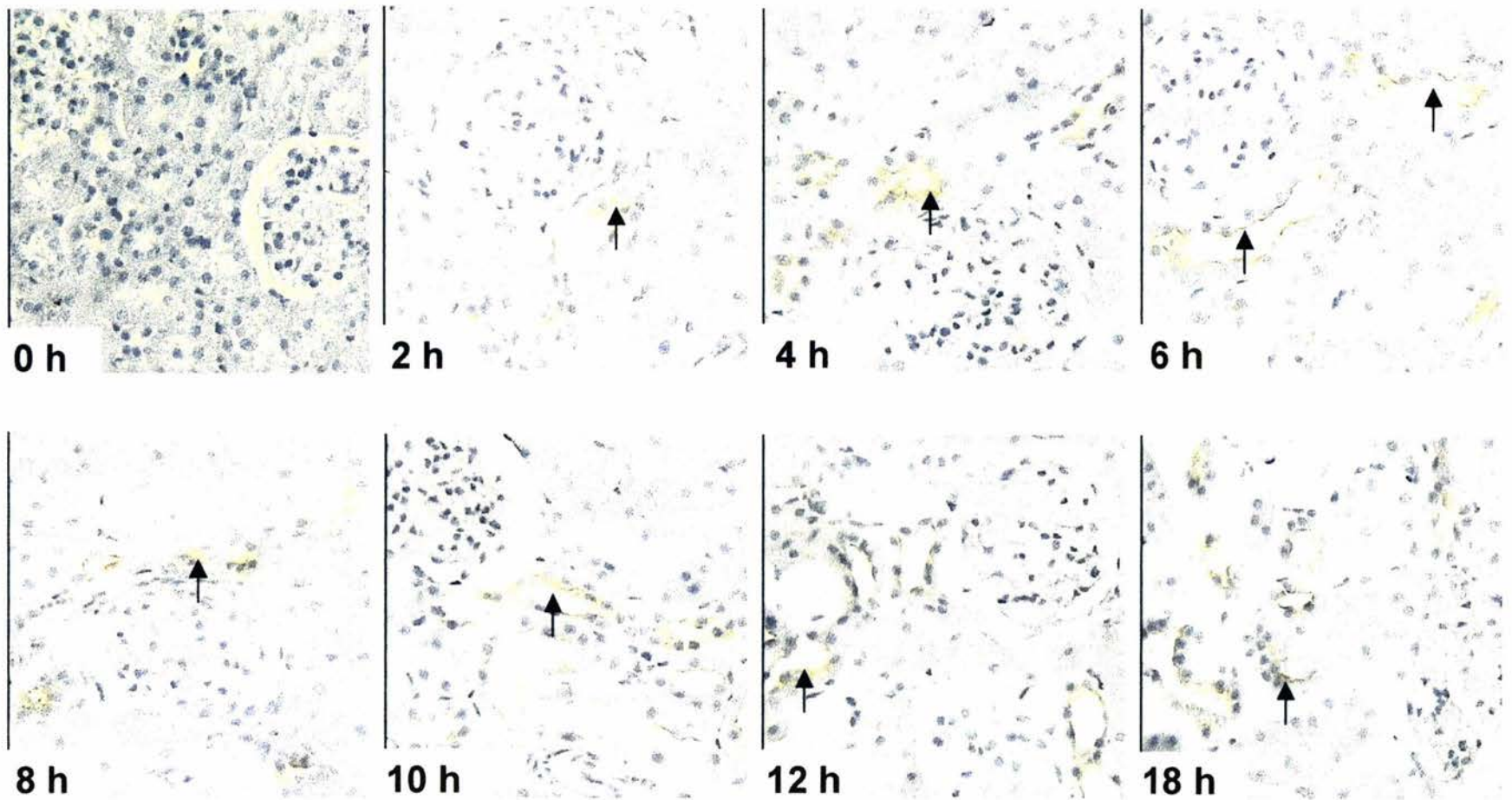
#### **2.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario**

El peso corporal no fue significativamente diferente entre los 4 grupos a ninguno de 2 tiempos estudiados. Por otra parte el volumen urinario solo aumentó ( $P < 0.05$ ) en el grupo de  $K_2Cr_2O_7$  a las 48 h y el pretratamiento con  $SnCl_2$  previene su aumento (24h, CT:  $7.1 \pm 0.9$ ;  $K_2Cr_2O_7$ :  $7 \pm 1.1$ ;  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$ :  $8.8 \pm 1.6$ ;  $SnCl_2$ :  $7.1 \pm 0.8$ ) (48, CT:  $9.2 \pm 1.5$ ;  $K_2Cr_2O_7$ :  $25.6 \pm 3.7$ ;  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$ :  $10.1 \pm 1.9$ ;  $SnCl_2$ :  $9.3 \pm 0.73$ ).

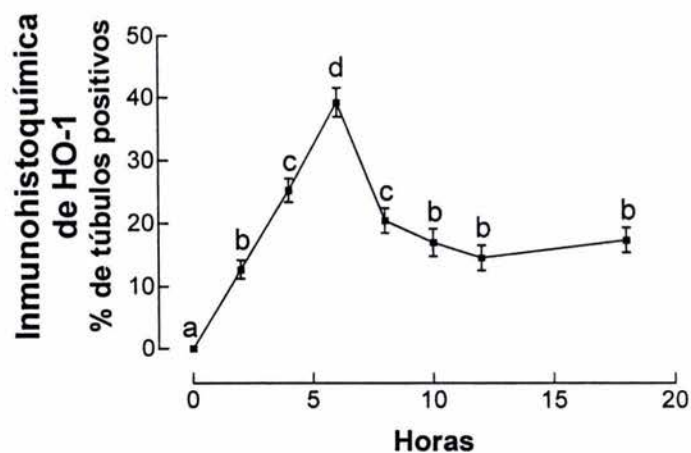
#### **2.2. Expresión de hemo oxigenasa 1**

Se realizó un protocolo en el que se probó si la administración previa de  $SnCl_2$  disminuía el daño inducido por el  $K_2Cr_2O_7$  en ratas. Previamente se determinó que 12 h para la preinducción era adecuado para tener una inducción significativa (Fig. 6).

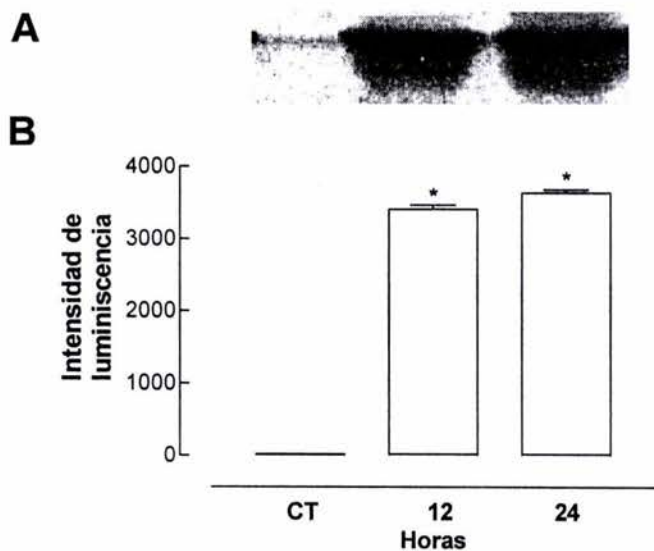
Se evaluó la presencia de la enzima cuantificando la HO-1 por "western blot" y la actividad de la HO. Se encontró que a las 24 h aumenta HO-1 (cuantificado por ambas técnicas) respecto al control en los grupos tratados ( $K_2Cr_2O_7$ ,  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  y  $SnCl_2$ ) y a las 48 h es mayor en los grupos tratados con  $SnCl_2$  ( $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  y  $SnCl_2$ ) respecto al control, pero menor con respecto a su grupo correspondiente a las 24 h. La cantidad y la actividad de la enzima son mayores en el grupo  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  que en el grupo  $SnCl_2$ . Este comportamiento es semejante en ambos tiempos pero de mayor magnitud a las 24 h (Fig. 7).



**Figura 4.** Curso temporal de la inducción de la HO-1 por  $K_2Cr_2O_7$ . Inmunohistoquímica 200X. Se observa un tinción positiva (→) por el color café.



**Figura 5.** Cuantificación de la expresión de hemo oxigenasa 1. Curso temporal de la cuantificación de la inducción de la HO-1 por  $K_2Cr_2O_7$ . Curso temporal de la IRA por  $K_2Cr_2O_7$ . Prom $\pm$ E.E.M. n=5 ratas por grupo. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos  $P<0.01$ .

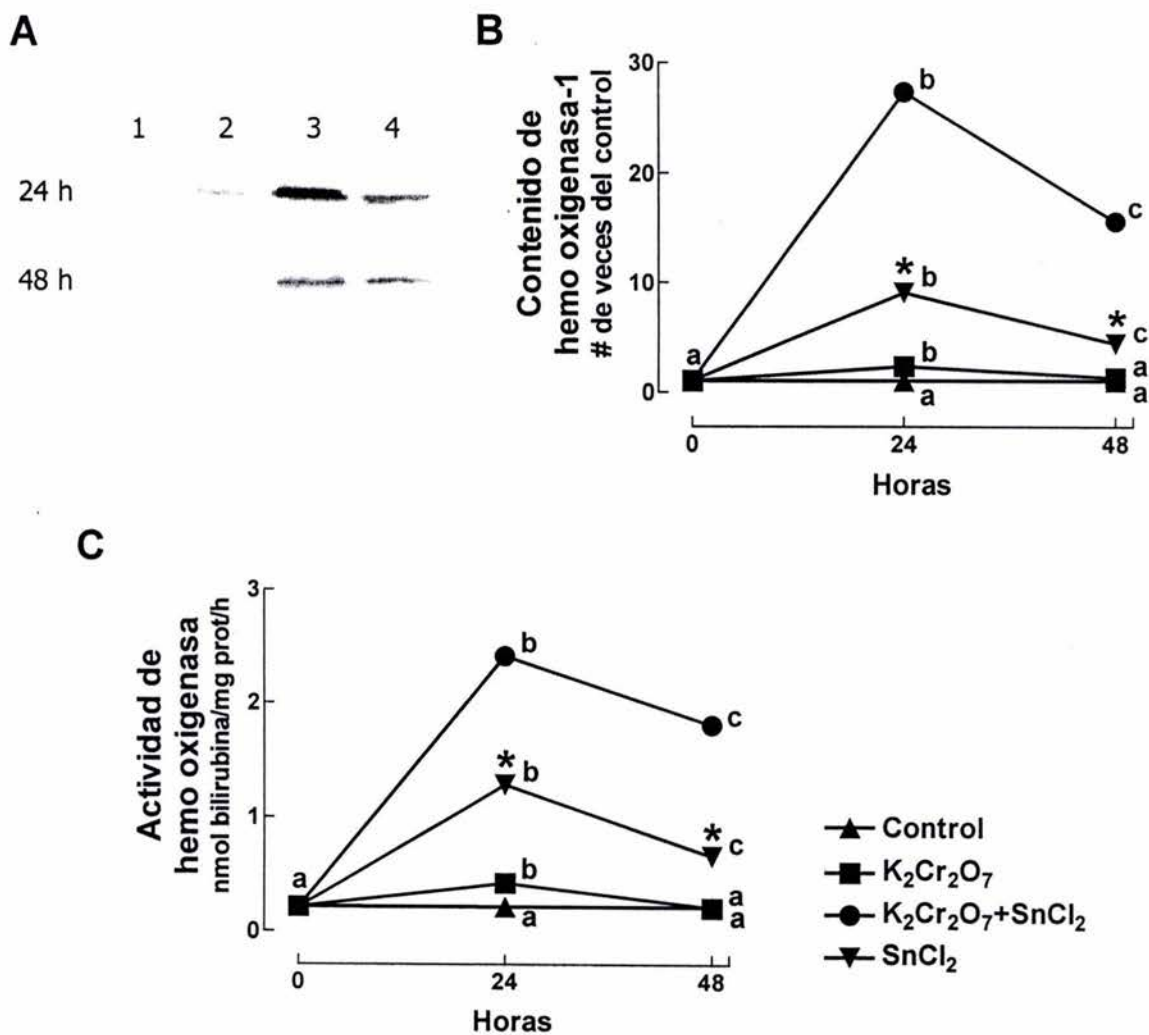


**Figura 6.** Inducción de HO-1 por  $SnCl_2$  en riñón de rata. "western blot" representativo para HO-1 (A). Intensidad de luminiscencia del ensayo de "western blot" (B). Prom $\pm$ E.E.M. n=2. \* $P<0.001$  contra el control.

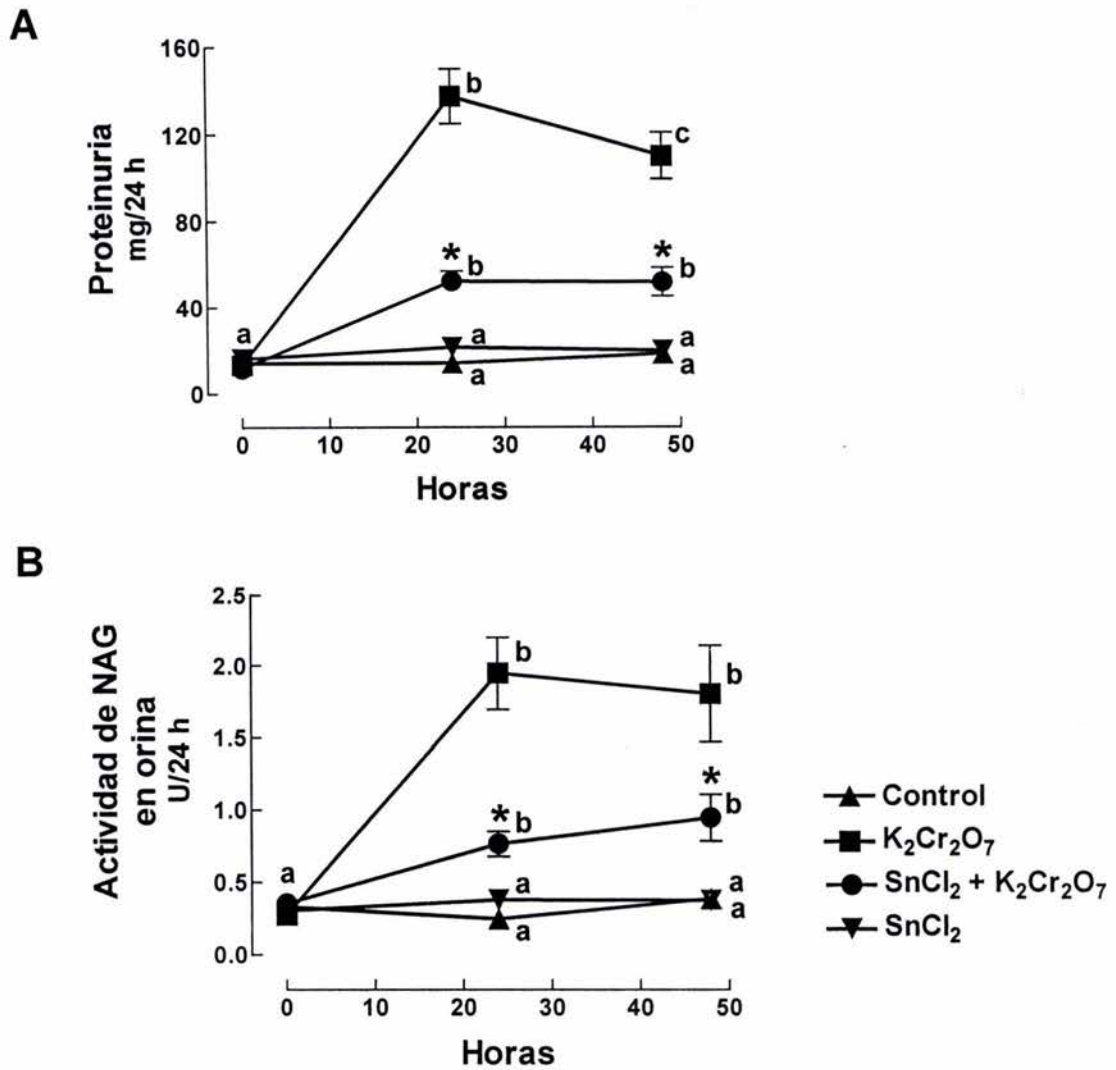
### 2.3. Función tubular

Encontramos que a las 24 h, la proteinuria y la excreción de NAG aumentaron en ratas tratadas con  $K_2Cr_2O_7$  y disminuyeron un 60% cuando se administró previamente  $SnCl_2$  (grupo

$K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ ) (Fig. 8A, B). A las 48 h aún se observaron valores altos de proteinuria y de excreción urinaria de NAG pero fueron menores con respecto a las 24 h en ratas tratadas con  $K_2Cr_2O_7$  y en las ratas pretratadas con  $SnCl_2$  (grupo  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ ) estos niveles disminuyeron a la mitad. Las ratas tratadas únicamente con  $SnCl_2$  no presentaron alteraciones en la excreción urinaria de NAG y proteínas totales.



**Figura 7.** "Western blot" representativo de la HO-1 (A), cuantificación de la HO-1 (B) y actividad de HO (C). Prom $\pm$ E.E.M. n=5-10. Grupos del mismo tratamiento con diferentes letras indica entre ellos P<0.001. Asterisco indica P<0.001 vs.  $K_2Cr_2O_7$  del mismo tiempo. 1 y 5: Control, 2 y 6:  $K_2Cr_2O_7$ , 3 y 7:  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ , 4 y 8:  $SnCl_2$ .



**Figura 8.** Marcadores de daño tubular: actividad de NAG en orina (A) y proteinuria (B). n=8-10. Prom±E.E.M. n=5-10. Grupos del mismo tratamiento con diferentes letras indica entre ellos P<0.001. Asterisco indica P<0.001 vs. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> del mismo tiempo.



### 2.3.1. Estructura tubular

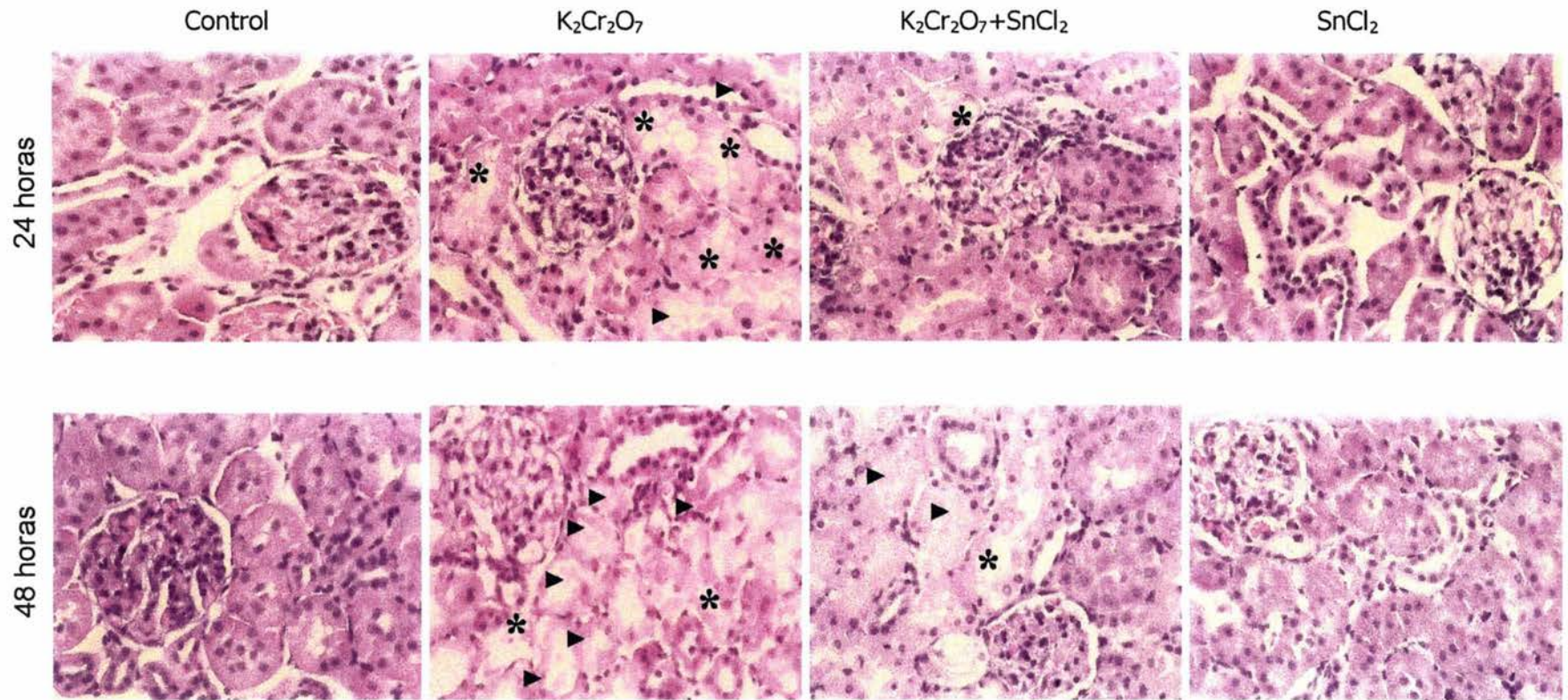
Se realizaron estudios histológicos para determinar el daño estructural (Fig. 9). El daño se localizó únicamente en los túbulos proximales. Se midieron como marcadores de daño: el área celular (denota células hinchadas), túbulos dañados (presencia de vacuolas y detritus), células dañadas por túbulo y área con vacuolas, debido a que la presencia de vacuolas, detritus y el hinchamiento son características de la necrosis.

A las 24 h en el grupo de  $K_2Cr_2O_7$  se encontró aumento del tamaño celular (241.4%), así como un 61.6, 51, y 27.4% (Tabla 1), respectivamente en los parámetros de daño medidos. En el grupo donde se preadministró  $SnCl_2$  (grupo  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ ), en general el daño se previno un 50% respecto al grupo  $K_2Cr_2O_7$  a las 24 h. A las 48 h sólo se midió el área con vacuolas debido a la dificultad para apreciar los límites celulares a las 48 h. Se encontró un 54.4% de área con vacuolas en el grupo  $K_2Cr_2O_7$  y en el grupo  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$  se previene este daño a solo un 42.2% (Tabla 1). Los grupos control y  $SnCl_2$  presentan valores semejantes de área celular y no se observó necrosis.

**Tabla 1.** Cuantificación del daño histológico a las 24 y 48 h.

	tiempo	Control	$K_2Cr_2O_7$	$K_2Cr_2O_7$ + $SnCl_2$	$SnCl_2$
% de área celular	24 h	99.9±3.2 <sup>a</sup>	241.4±7.7 <sup>b</sup>	161.2±2.6 <sup>c</sup>	92.6±1.4 <sup>a</sup>
	48 h	No	Nd	Nd	No
% de túbulos dañados	24 h	No	61.6±2.7 <sup>a</sup>	25.3±2.4 <sup>b</sup>	No
	48 h	No	Nd	Nd	No
% de células dañadas / túbulo	24 h	No	51.0±1.7 <sup>a</sup>	24.5±1.3 <sup>b</sup>	No
	48 h	No	Nd	Nd	No
% de área con vacuolas / túbulo	24 h	No	27.4±0.7 <sup>a</sup>	13.2±0.7 <sup>b</sup>	No
	48 h	No	54.4±1.9 <sup>a</sup>	42.2±2.3 <sup>b</sup>	No

Prom±E.E.M. n=5 ratas por grupo, 15 túbulos/rata. No: no observado, Nd: no determinado. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos  $P<0.001$ .



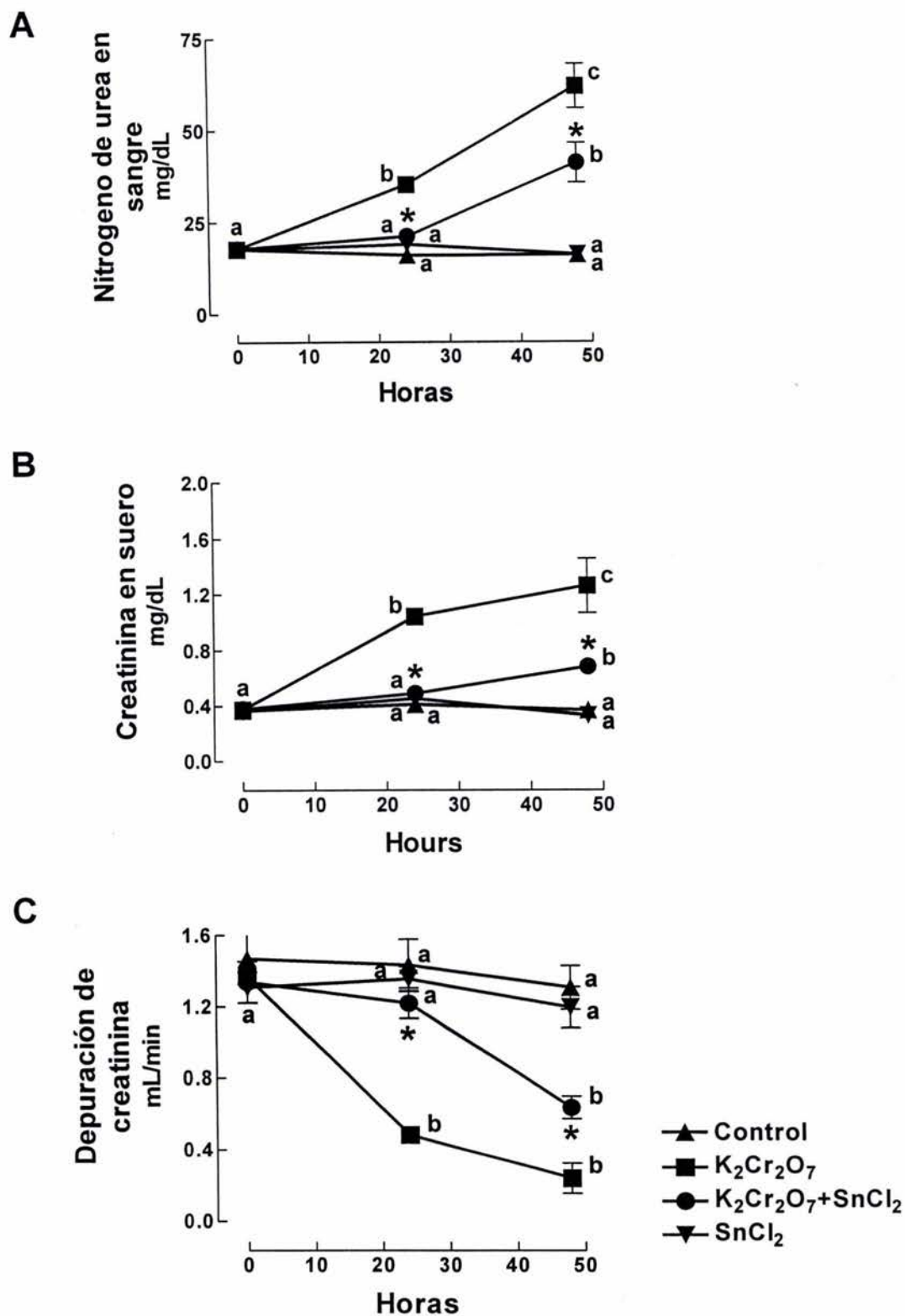
**Figura 9.** Estudio histológico a las 24 y 48 h. Tinción de hematoxilina y eosina. 400X. Se observan vacuolas (\*) y detritus (▶) únicamente en los túbulos proximales.

## 2.4. Función glomerular

En el grupo  $K_2Cr_2O_7$  se observó un aumento de BUN y de la creatinina en suero, además de una disminución de la depuración de creatinina. En las ratas pretratadas con  $SnCl_2$  (grupo  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ ) estos parámetros se observaron prácticamente normales a las 24 h. A las 48 h el daño por el  $K_2Cr_2O_7$  aumentó y en el grupo tratado previamente con  $SnCl_2$  el daño disminuyó a la mitad. El grupo control y el grupo tratado únicamente con  $SnCl_2$  presentaron niveles normales de BUN, creatinina y de depuración de creatinina (Fig. 10).

## 2.5. Otras enzimas antioxidantes:

Con el propósito de analizar si otra enzima antioxidante pudiera estar involucrada en el efecto protector del  $SnCl_2$  en riñón, se midieron la actividad y la cantidad de proteína de algunas enzimas antioxidantes. Se encontró que la cantidad de enzima, así como la actividades de la Cu,Zn-SOD, la Mn-SOD y la GR no cambiaron con ningún tratamiento en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 11, Tablas 2 y 3). La cantidad de enzima y la actividad de la catalasa disminuyeron (33 y 45% respectivamente) a las 48 h en los grupos  $K_2Cr_2O_7$ ,  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$  y  $SnCl_2$  (Tablas 2 y 3). Es decir el  $K_2Cr_2O_7$  disminuyó la presencia de esta enzima y el pretratamiento con  $SnCl_2$  no fue capaz de prevenirlo. La actividad de GPx disminuye un 25% en el grupo  $K_2Cr_2O_7$  y el pretratamiento con  $SnCl_2$  en el grupo  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$  previno esta disminución (Tabla 2).

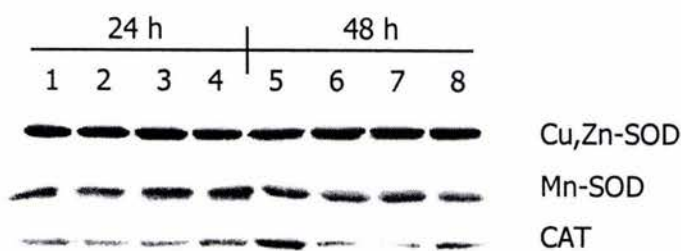


**Figura 10.** Marcadores de daño glomerular: nitrógeno de urea en sangre (BUN) (A), creatinina en suero (B) y depuración de creatinina (C). Prom±E.E.M. n=5-10. Grupos del mismo tratamiento con diferentes letras indica entre ellos P<0.001. Asterisco indica P<0.001 vs. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> del mismo tiempo.

**Tabla 2.** Actividad de Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GR, CAT y GPx en riñón.

	tiempo	Control	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +SnCl <sub>2</sub>	SnCl <sub>2</sub>
GPx (U/mg proteína)	24 h	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>
	48 h	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.09±0.01 <sup>b</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.13±0.01 <sup>a</sup>
CAT (k/mg proteína)	24 h	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>a</sup>
	48 h	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>b</sup>	0.10±0.01 <sup>b</sup>	0.14±0.01 <sup>b</sup>
GR (mU/mg proteína)	24 h	80.4±6.5 <sup>a</sup>	80.8±4.9 <sup>a</sup>	83.4±2.9 <sup>a</sup>	77.8±1.8 <sup>a</sup>
	48 h	78.6±2.6 <sup>a</sup>	79.9±4.7 <sup>a</sup>	79.6±4.5 <sup>a</sup>	75.9±2.2 <sup>a</sup>
Cu,Zn-SOD (U/mg proteína)	24 h	11.8±0.4 <sup>a</sup>	12.9±0.4 <sup>a</sup>	13.4±0.7 <sup>a</sup>	12.1±0.6 <sup>a</sup>
	48 h	12.2±0.6 <sup>a</sup>	11.7±0.9 <sup>a</sup>	12.6±0.5 <sup>a</sup>	12.6±0.5 <sup>a</sup>
Mn-SOD (U/mg proteína)	24 h	4.3±0.3 <sup>a</sup>	5.1±0.2 <sup>a</sup>	5.2±0.3 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>
	48 h	4.4±0.3 <sup>a</sup>	4.0±0.3 <sup>a</sup>	4.9±0.4 <sup>a</sup>	5.0±0.3 <sup>a</sup>

Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.



**Figura 11.** "Western blot" representativo de la Cu,Zn-SOD, la Mn-SOD y la CAT, 1 y 5: Control, 2 y 6: K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 3 y 7: K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>, 4 y 8: SnCl<sub>2</sub>.

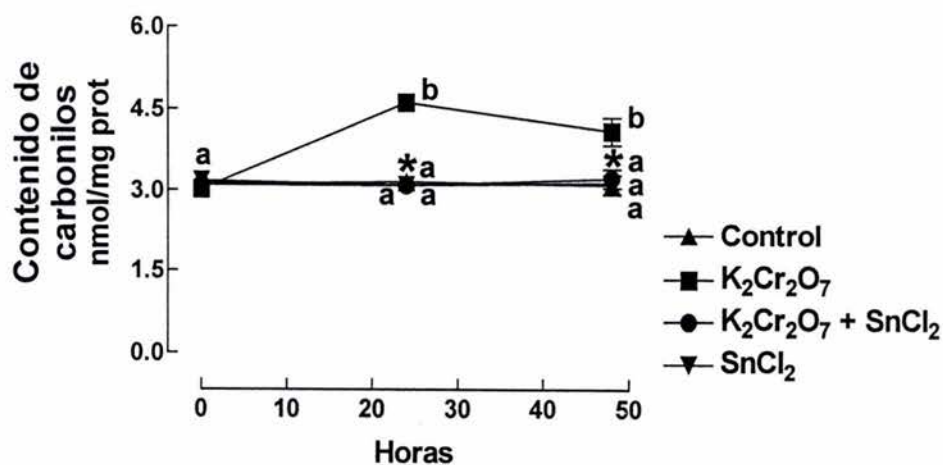
**Tabla 3.** Cuantificación de la cantidad de Cu,Zn-SOD, Mn-SOD y CAT en riñón.

	tiempo	Control	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +SnCl <sub>2</sub>	SnCl <sub>2</sub>
Cu,Zn-SOD	24 h	1.00±0.05 <sup>a</sup>	1.00±0.03 <sup>a</sup>	1.01±0.04 <sup>a</sup>	0.99±0.03 <sup>a</sup>
	48 h	1.01±0.01 <sup>a</sup>	0.94±0.03 <sup>a</sup>	0.98±0.04 <sup>a</sup>	1.01±0.05 <sup>a</sup>
Mn-SOD	24 h	1.00±0.04 <sup>a</sup>	1.07±0.07 <sup>a</sup>	1.06±0.05 <sup>a</sup>	1.03±0.03 <sup>a</sup>
	48 h	1.00±0.03 <sup>a</sup>	0.96±0.03 <sup>a</sup>	1.14±0.03 <sup>a</sup>	0.99±0.07 <sup>a</sup>
CAT	24 h	1.02±0.05 <sup>a</sup>	1.01±0.04 <sup>a</sup>	0.94±0.02 <sup>a</sup>	0.94±0.03 <sup>a</sup>
	48 h	1.00±0.06 <sup>a</sup>	0.68±0.06 <sup>b</sup>	0.65±0.06 <sup>b</sup>	0.75±0.06 <sup>b</sup>

Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica P<0.001.

## 2.6. Estrés oxidativo

Se midió la cantidad de proteínas oxidadas como marcador de estrés oxidativo. Se encontró que dicha cantidad aumentó en el grupo tratado con K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y en el grupo donde se preadministró el SnCl<sub>2</sub> no se observó aumento (Fig. 12).



**Figura 12.** Marcador de estrés oxidativo: contenido de carbonilos en proteínas. Prom±E.E.M. n=5-10. Grupos del mismo tratamiento con diferentes letras indica entre ellos P<0.001. Asterisco indica P<0.001 vs. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> del mismo tiempo.

### **3. Importancia de la hemo oxigenasa en la protección del SnCl<sub>2</sub> en la IRA por K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>**

Para demostrar la importancia de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) en la protección del SnCl<sub>2</sub> se administró un inhibidor específico de la enzima, protoporfirina de zinc (ZnPP), antes del inductor (SnCl<sub>2</sub>) de la enzima.

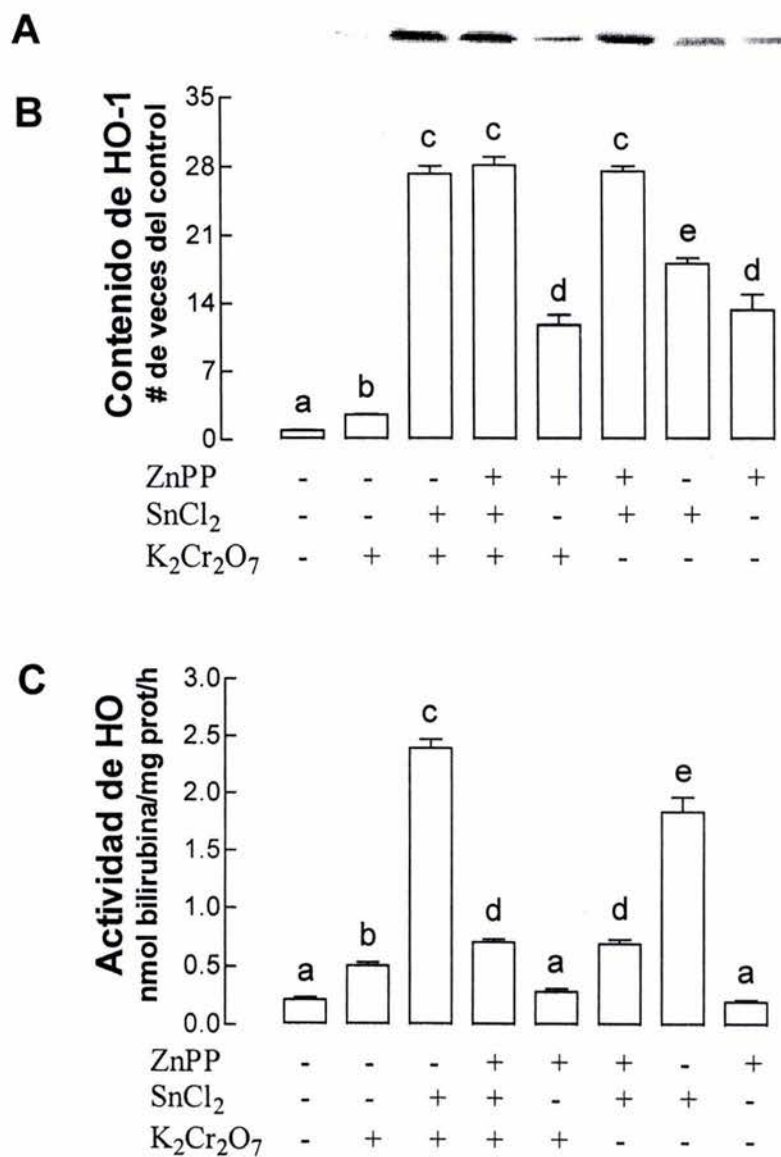
#### **3.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario**

El peso corporal no fue significativamente diferente entre los 8 grupos tiempos estudiados. De igual forma el volumen urinario no presentó diferencias entre los grupos (CT: 9.8±1; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 17.6±1.1; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>: 9.9±1.4; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>+ZnPP: 15.2±0.9; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+ZnPP: 14.8±0.8; SnCl<sub>2</sub>+ZnPP: 7.8±1.5; SnCl<sub>2</sub>: 7.1±1; ZnPP: 7.8±1.2 ml).

#### **3.2. Expresión de HO-1**

Se realizó la cuantificación de la cantidad de HO-1 por "western blot" y se midió la actividad de la HO. Se encontró un aumento de la cantidad (2.6 veces) y la actividad en el grupo K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. En los grupos K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>+ZnPP, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+ZnPP, SnCl<sub>2</sub>+ZnPP, SnCl<sub>2</sub> y ZnPP se observó un aumento de 27, 28, 11, 27, 18 y 13 veces, respectivamente, en la cantidad de enzima (Fig. 13A). Sin embargo, debido a la presencia del inhibidor los grupos K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>+ZnPP, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+ZnPP, SnCl<sub>2</sub>+ZnPP y ZnPP tienen una actividad muy baja (Fig. 13B). También podemos observar que el grupo de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub> presentó una actividad mayor a la del grupo SnCl<sub>2</sub> y que los grupos donde se administró ZnPP solo (grupo ZnPP) o con otro compuesto (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>+ZnPP, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+ZnPP y SnCl<sub>2</sub>+ZnPP), presentaron una actividad basal o mayor que ésta (Fig. 13B).

Se inmunolocalizó la HO-1 en cortes de tejido renal. Se encontró que se localiza en las células de los túbulos proximales y no en túbulos distales ni en el glomérulo. En las ratas control no se detectó la enzima, en las ratas tratadas solo con K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> se detectó una discreta señal positiva. Los grupos K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>+ZnPP, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+ZnPP, SnCl<sub>2</sub>+ZnPP y SnCl<sub>2</sub> presentaron una señal más intensa y se observó que algunos túbulos proximales expresaron mayor cantidad de la enzima. La intensidad es menor en el grupo ZnPP (Fig. 14).



**Figura 13.** "Western blot" representativo de la HO-1 (A), contenido de HO-1 medido por "western blot" (B) y actividad de HO (C). Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.

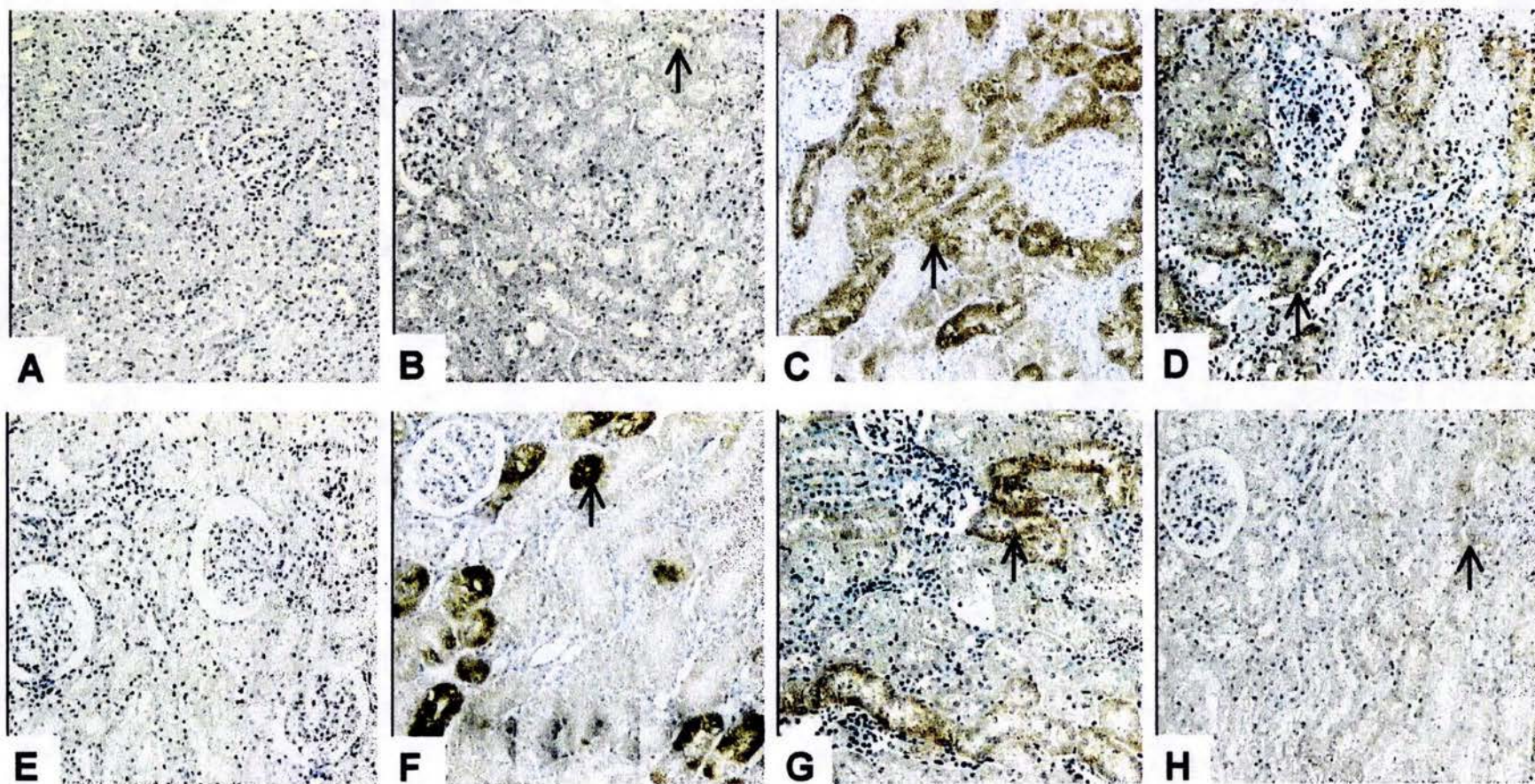


### **3.3. Función tubular**

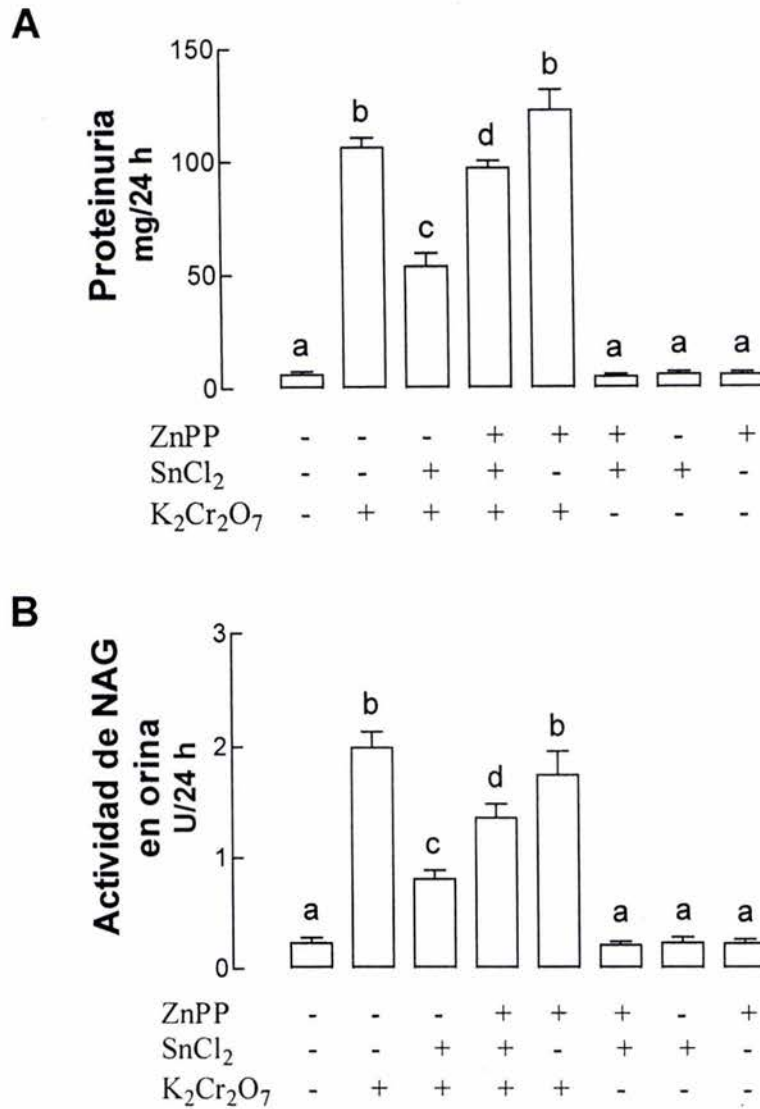
En la figura 15 observamos que los grupos de  $K_2Cr_2O_7$  y  $K_2Cr_2O_7+ZnPP$  tienen el mayor daño tubular, representado por la proteinuria y la actividad de NAG en orina. En el grupo de  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$  se observó al menos el 50% de protección en ambos parámetros. Esta protección disminuyó significativamente en el grupo de  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2+ZnPP$ , pero solo la proteinuria es igual a la del grupo  $K_2Cr_2O_7$ . Los grupos control (CT), ZnPP,  $SnCl_2$  y  $SnCl_2+ZnPP$  presentaron valores semejantes.

#### **3.3.1. Estructura tubular**

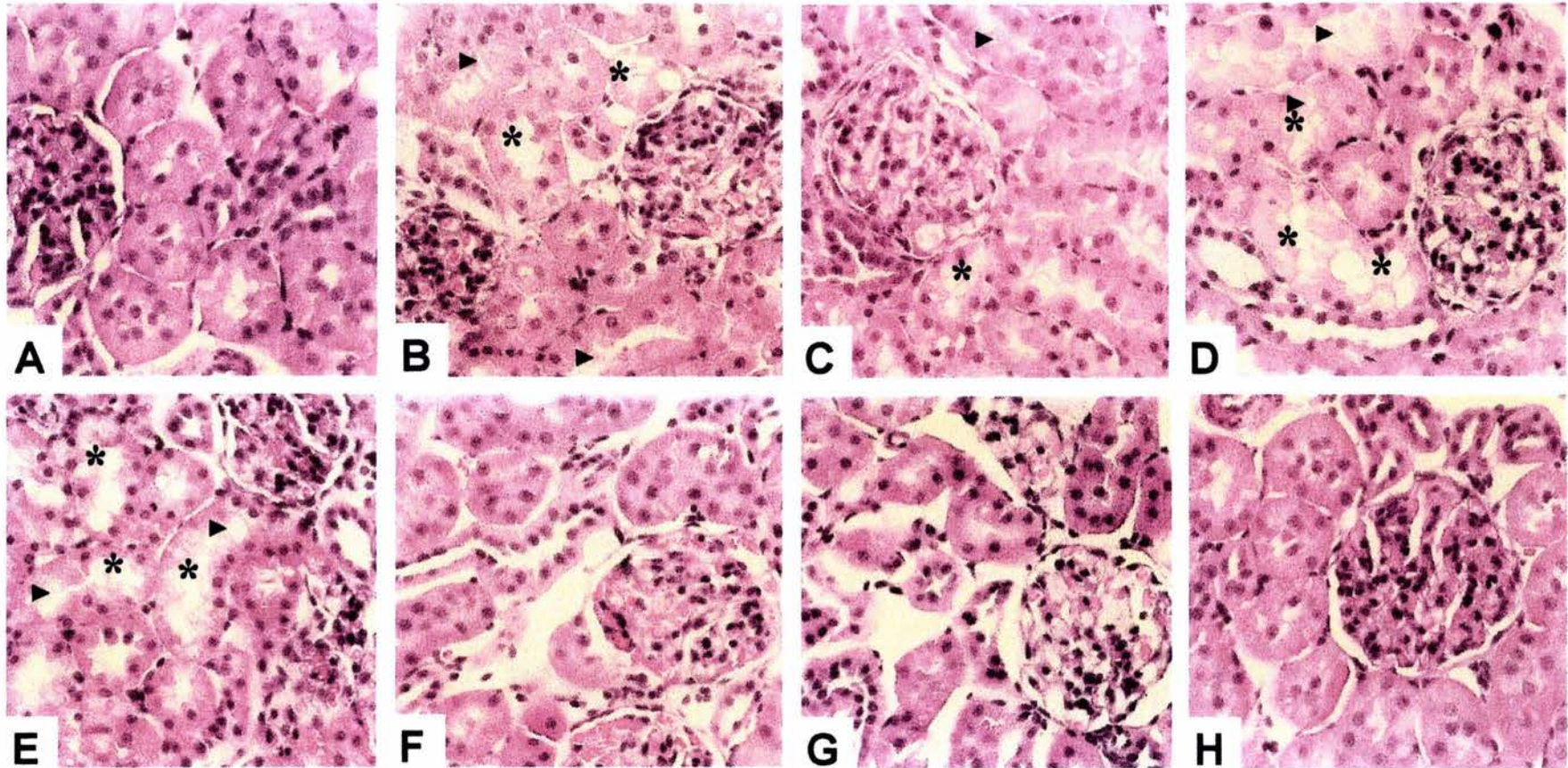
Se determinó el daño histológico presente en los diferentes grupos (Fig. 16). Se encontró un 58, 60 y 70% de túbulos dañados en los grupos  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2+ZnPP$ ,  $K_2Cr_2O_7$  y  $K_2Cr_2O_7+ZnPP$ , respectivamente. En el grupo  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$  se observó una prevención del 50 % en el daño, respecto del grupo  $K_2Cr_2O_7$ . Los grupos CT, ZnPP,  $SnCl_2$  y  $SnCl_2+ZnPP$  presentaron una histología normal (Tabla 4).



**Figura 14.** Inmunohistoquímica de la HO-1 contrastada con hematoxilina. **A.** Control. **B.**  $K_2Cr_2O_7$ . **C.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ . **D.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2+ZnPP$ . **E.**  $K_2Cr_2O_7+ZnPP$ . **F.**  $SnCl_2+ZnPP$ . **G.**  $SnCl_2$ . **H.**  $ZnPP$ . 100 X. Se observa un tinción positivo ( $\rightarrow$ ) por el color café.



**Figura 15.** Marcadores de daño tubular: proteinuria (A), actividad de NAG en orina (B). Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.



**Figura 16.** Tinción de hematoxilina y eosina. Estudio histológico a las 24 h. **A.** Control. **B.**  $K_2Cr_2O_7$ . **C.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ . **D.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2+ZnPP$ . **E.**  $K_2Cr_2O_7+ZnPP$ . **F.**  $SnCl_2+ZnPP$ . **G.**  $SnCl_2$ . **H.**  $ZnPP$ . 400 X. Se observan vacuolas (\*) y detritus (▶) únicamente en los túbulos proximales.

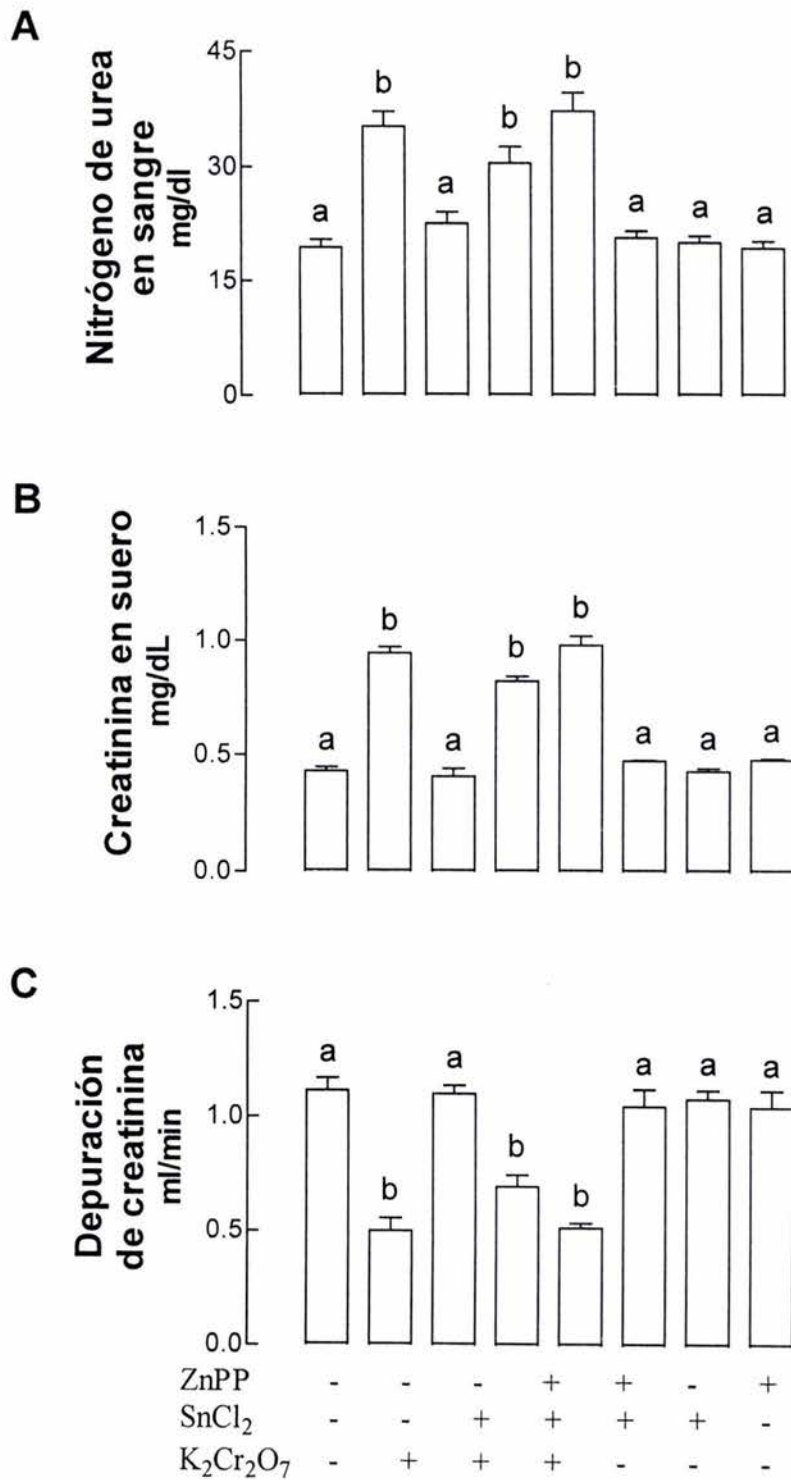
**Tabla 4.** Cuantificación del daño histológico a las 24 h.

Grupo	% de túbulos con daño histológico	% de células con daño / túbulo	% de área celular	% de área con vacuolas
CT	No	No	100±3 <sup>a</sup>	No
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	60±5 <sup>a</sup>	51±2 <sup>a</sup>	241±8 <sup>b</sup>	27±1 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +SnCl <sub>2</sub>	31±2 <sup>b</sup>	25±1 <sup>b</sup>	161±3 <sup>c</sup>	13±1 <sup>b</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +SnCl <sub>2</sub> +ZnPP	54±5 <sup>a</sup>	49±2 <sup>a</sup>	232±4 <sup>b</sup>	27±1 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> +ZnPP	68±3 <sup>a</sup>	49±2 <sup>a</sup>	240±5 <sup>b</sup>	28±1 <sup>a</sup>
SnCl <sub>2</sub> +ZnPP	No	No	99±2 <sup>a</sup>	No
SnCl <sub>2</sub>	No	No	100±3 <sup>a</sup>	No
ZnPP	No	No	98±3 <sup>a</sup>	No

Prom±E.E.M. n=5 ratas por grupo, 15 túbulos/rata. No: no observado. Grupos con diferentes letras indica P<0.001.

### 3.4. Función glomerular

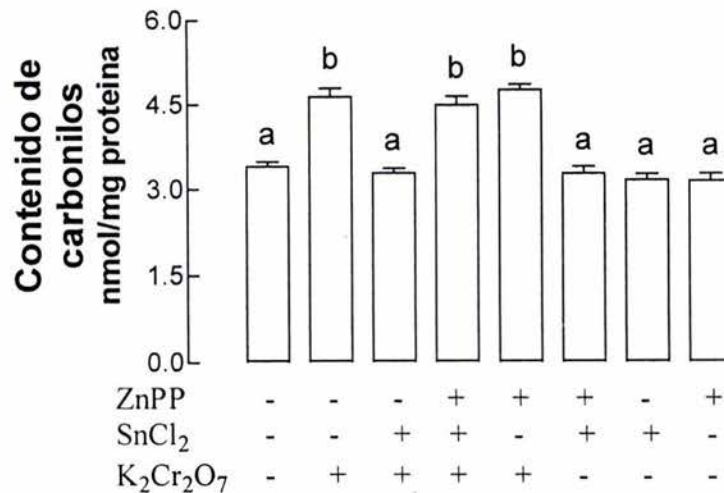
Se determinaron los marcadores de daño glomerular, BUN, creatinina en suero y depuración de creatinina. Se observó que los grupos K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+ZnPP presentaron el mayor daño glomerular, es decir, aumento de BUN y creatinina en suero, además de la disminución de la depuración de creatinina. En el grupo K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub> se observaron valores normales en los tres parámetros. Esta protección disminuyó significativamente en el grupo de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>+ZnPP, siendo los valores iguales a los del grupo de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Los grupos CT, ZnPP, SnCl<sub>2</sub> y SnCl<sub>2</sub>+ZnPP presentaron valores normales (Fig. 17).



**Figura 17.** Marcadores de daño glomerular: BUN (**A**), creatinina en suero (**B**) y depuración de creatinina. **C.** Prom $\pm$ E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.

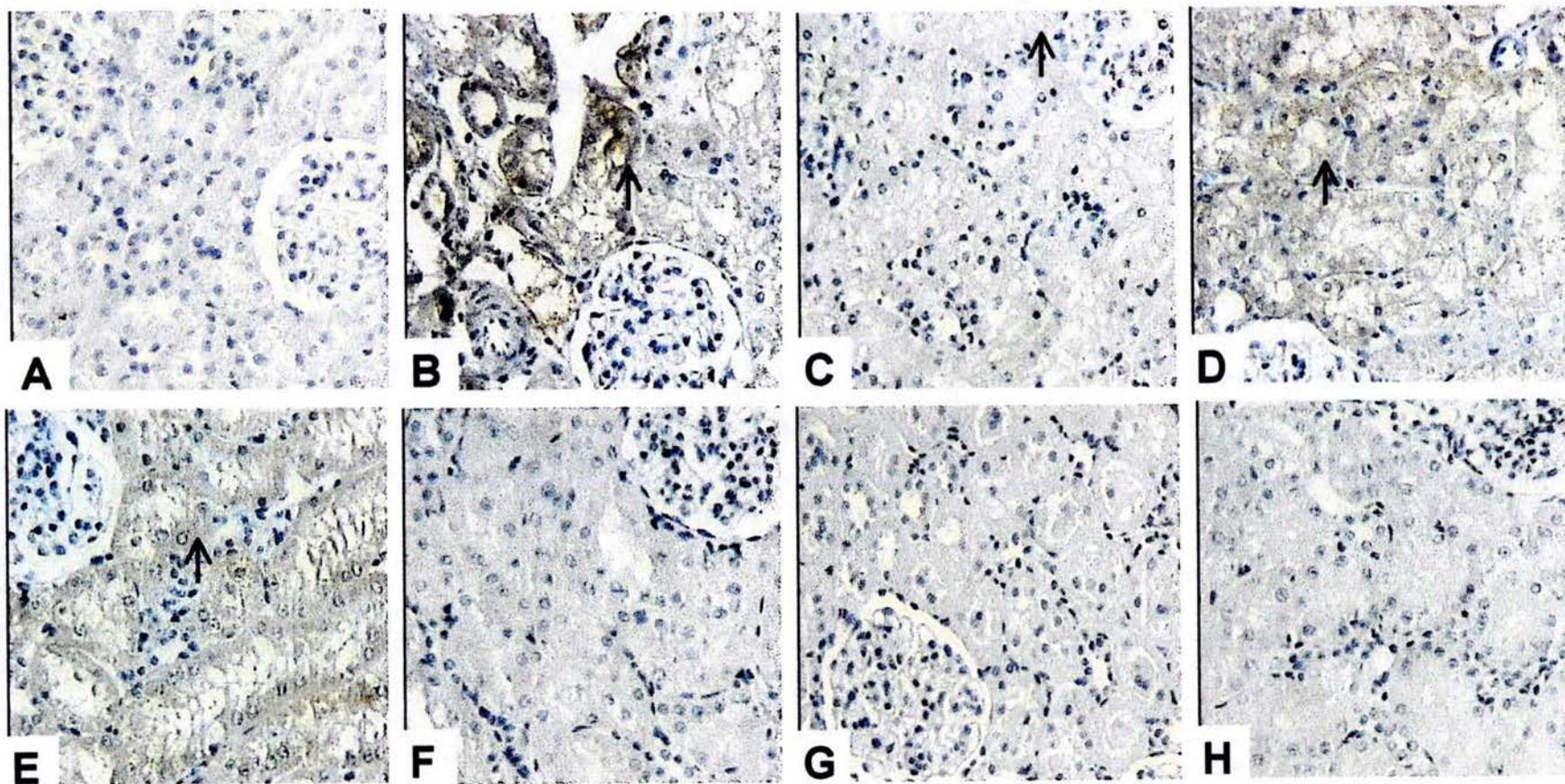
### 3.5. Estrés oxidativo

Se cuantificaron los carbonilos presentes en proteínas como marcador de estrés oxidativo. Encontramos que en los grupos  $K_2Cr_2O_7$ ,  $K_2Cr_2O_7+ZnPP$  y  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2+ZnPP$  la cantidad se elevó un 36% comparado con el control, es decir el efecto protector del  $SnCl_2$  se perdió con el pretratamiento con ZnPP (Fig. 18). En cambio en el grupo  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$  esta disminución se previno. Los grupos  $SnCl_2+ZnPP$ ,  $SnCl_2$  y  $ZnPP$ , presentaron valores semejantes al control.



**Figura 18.** Contenido de carbonilos. Prom $\pm$ E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencias entre ellos P<0.001.

Se realizó una inmunohistocalización de nitrotirosina como marcador de estrés oxidativo. Se encontró una señal prácticamente indetectable en los grupos CT,  $SnCl_2+ZnPP$ ,  $SnCl_2$  y  $ZnPP$ . La mayor señal se encontró en los grupos  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2+ZnPP$ ,  $K_2Cr_2O_7+ZnPP$  y  $K_2Cr_2O_7$ . En el grupo de  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$  se observó menor presencia de nitrotirosina que en los grupos antes mencionados (Fig. 19).



**Figura 19.** Inmunohistoquímica de nitrotirosina contrastada con hematoxilina. **A.** Control. **B.**  $K_2Cr_2O_7$ . **C.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2$ . **D.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2+ZnPP$ . **E.**  $K_2Cr_2O_7+ZnPP$ . **F.**  $SnCl_2+ZnPP$ . **G.**  $SnCl_2$ . **H.**  $ZnPP$ . 400 X. Se observa un tinción positivo ( $\rightarrow$ ) por el color café.



#### **4. Efecto del SnCl<sub>2</sub> administrado al mismo tiempo o 12 h después que el K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>**

Se realizó un protocolo para determinar si es indispensable preinducir a la HO-1, o si la inducción al mismo tiempo que el nefrotóxico o después de éste, es posible observar un efecto protector. Para esto se administró el K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y SnCl<sub>2</sub> al mismo tiempo (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-0) o 12 h después que el K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-12) y se sacrificaron los animales 24 h después de la administración del K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

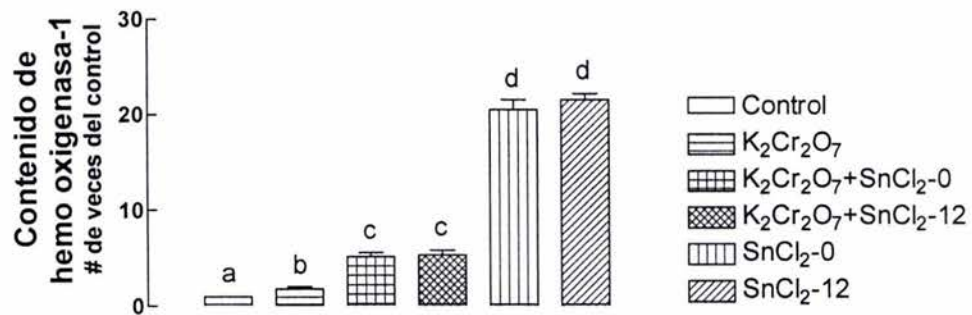
##### **4.1. Efecto en el peso corporal y en el volumen urinario**

El peso corporal no fue significativamente diferente entre los 6 grupos tiempos estudiados. De igual forma el volumen urinario no presento diferencias entre los grupos (CT: 10.8±1.1; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 15.6±1.5; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-0: 12.9±1.3; K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-12: 15.8±2.5; SnCl<sub>2</sub>-0: 9.8±0.9; SnCl<sub>2</sub>-12: 10.4±0.9 ml).

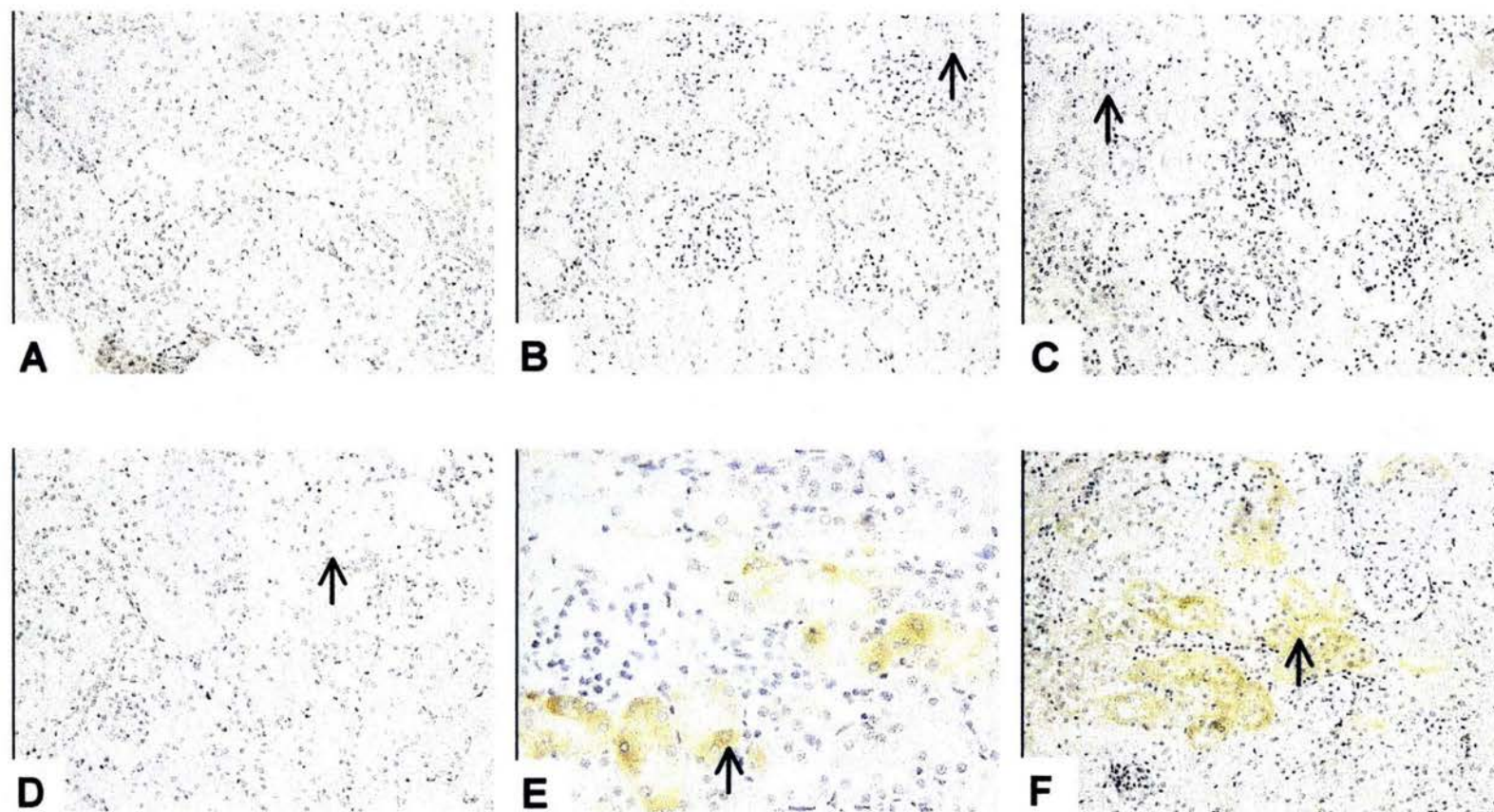
##### **4.2. Expresión de HO-1**

Se midió la cantidad de HO-1 por "western blot" y se encontró un aumento en el grupo de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> con respecto al control, como ya se había visto (Fig. 20). En los grupos donde solo se administró SnCl<sub>2</sub> (SnCl<sub>2</sub>-0 y SnCl<sub>2</sub>-12) se observó un aumento de más de 20 veces como en otros protocolos. Los grupos donde se administraron ambos (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-0 y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-12), la cantidad de enzima es mucho menor que cuando se administró solo el SnCl<sub>2</sub> (Fig. 20).

Se realizó la inmunolocalización de la HO-1 en cortes de tejido y se encontró una señal negativa en el control, una señal muy débil en los grupos de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-0 y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-12. En los grupos donde se administró solo SnCl<sub>2</sub> (SnCl<sub>2</sub>-0 y SnCl<sub>2</sub>-12) se encontró la señal más intensa (Fig. 21).



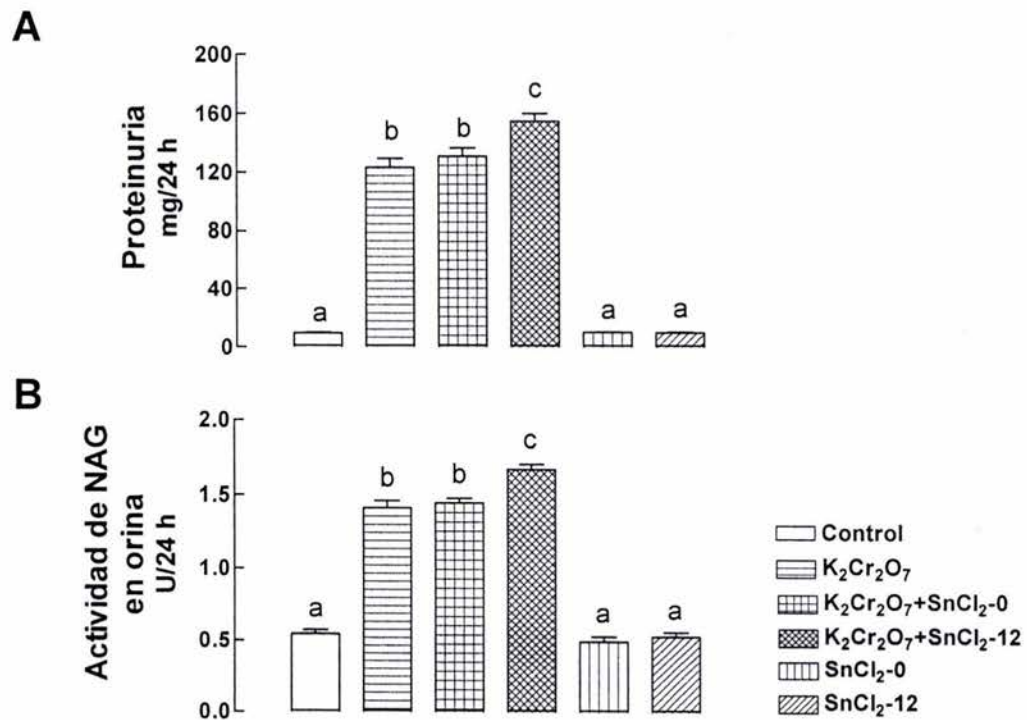
**Figura 20.** Contenido de HO-1. Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.



**Figura 21.** Inmunolocalización de la HO-1. **A.** Control. **B.**  $K_2Cr_2O_7$ . **C.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2-0$ . **D.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2-12$ . **E.**  $SnCl_2-0$ . **F.**  $SnCl_2-12$ . 100 X. Se observa un tinción positiva ( $\rightarrow$ ) por el color café.

### 4.3. Función tubular

Se encontró el mismo daño tubular en los grupos  $K_2Cr_2O_7$  y en el grupo donde se administraron al mismo tiempo el  $K_2Cr_2O_7$  y el inductor de la enzima ( $K_2Cr_2O_7+SnCl_2-0$ ). En el grupo donde se administró el  $SnCl_2$  12 h después del  $K_2Cr_2O_7$  ( $K_2Cr_2O_7+SnCl_2-12$ ) el daño fue mayor (Fig. 22). En los grupos control,  $SnCl_2-0$  y  $SnCl_2-12$  se obtuvieron valores semejantes (Fig. 22).



**Figura 22.** Marcadores de daño tubular: proteinuria (A) y actividad de NAG en orina (B). Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos  $P<0.001$ .

### **4.3.1. Estructura tubular**

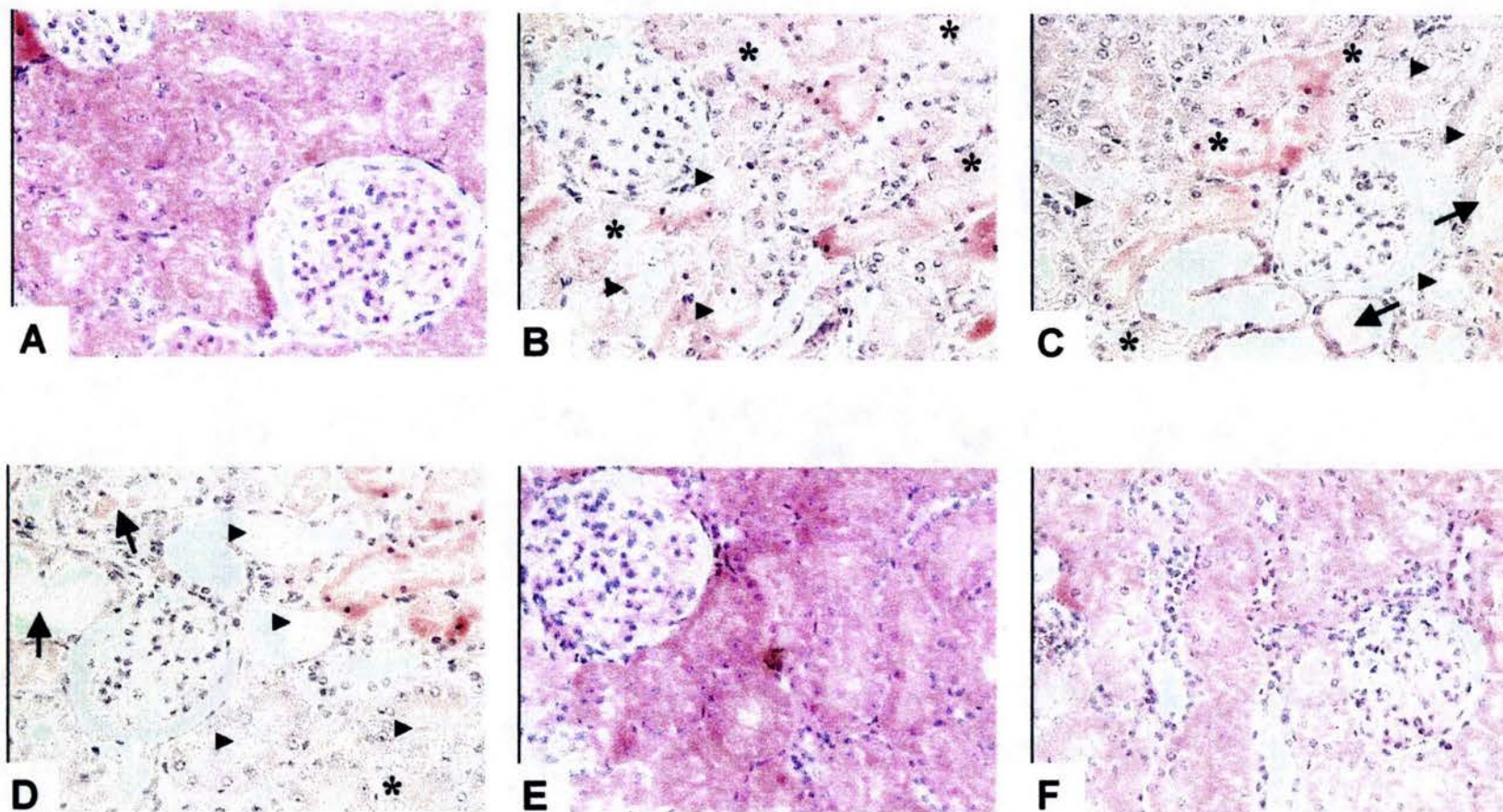
Los grupos control, SnCl<sub>2</sub>-0 y SnCl<sub>2</sub>-12 no presentaron ninguna alteración histológica (Fig. 23A, 23E y 23F). En el grupo de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> se observó daño (vacuolas y detritus) en los túbulos proximales (Fig. 23B). En el grupo donde se administraron ambos compuestos al mismo tiempo (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-0) además de las características antes mencionadas se presentaron núcleos picnóticos, un citoplasma acidofílico y algunos cilindros luminales (Fig. 23C). Sin embargo cuando se administró el SnCl<sub>2</sub> 12 h después del K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-12) se observó una necrosis acidofílica muy marcada con cilindros intracelulares (Fig. 23D).

### **4.4. Función glomerular**

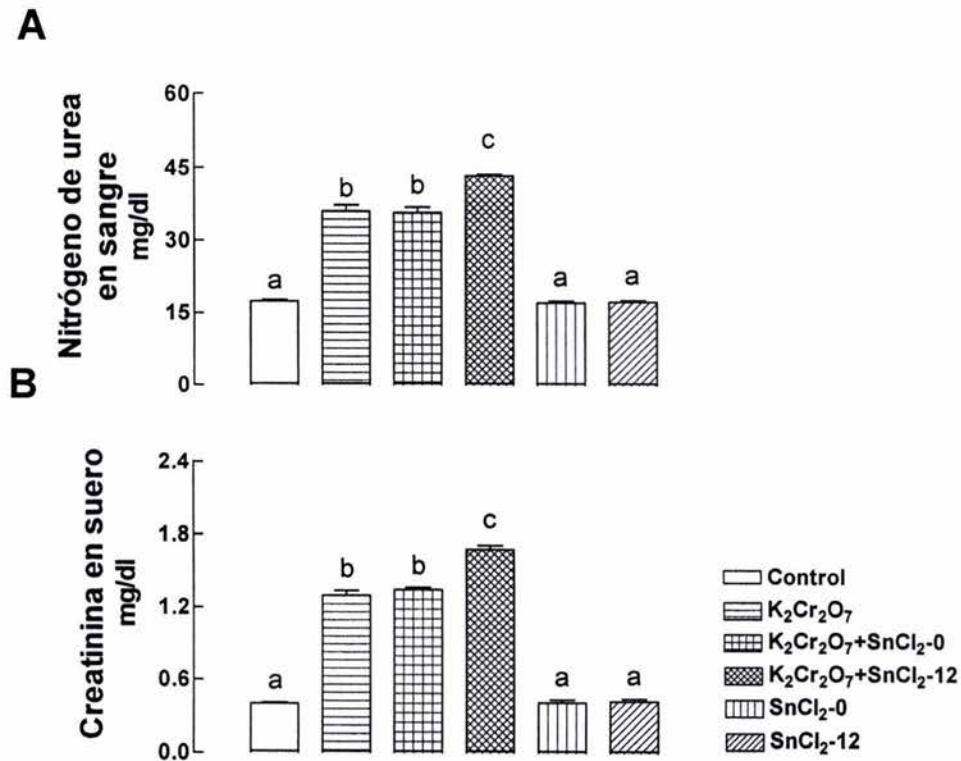
Los grupos K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-0 presentaron los mismos niveles de BUN y de creatinina en suero, sin embargo el grupo K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-12 presentó aún niveles más altos, es decir presenta mayor daño (Fig. 24). Los grupos control, SnCl<sub>2</sub>-0 y SnCl<sub>2</sub>-12 presentaron niveles semejantes de BUN y creatinina en suero.

### **4.5. Estrés oxidativo**

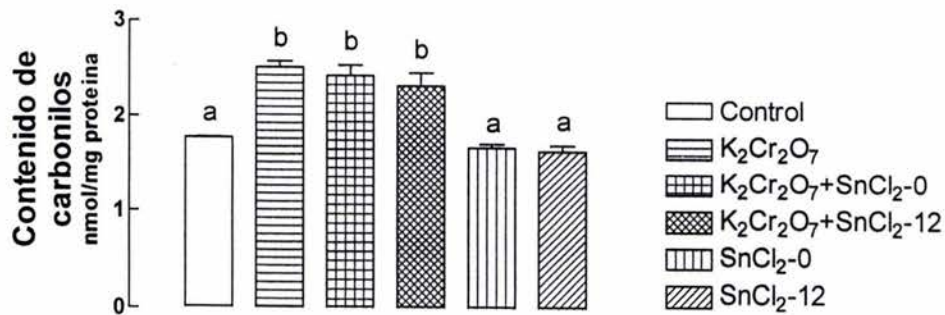
Se midió el contenido de carbonilos y se encontró un aumento en el grupo K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y este aumento no se previno al administrar el SnCl<sub>2</sub> al mismo tiempo o 12 h después que el K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-0 y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+SnCl<sub>2</sub>-12) (Fig. 25). Sin embargo, el estrés oxidativo no fue mayor en ningún de estos últimos grupos. En los grupos control, SnCl<sub>2</sub>-0 y SnCl<sub>2</sub>-12 los niveles fueron semejantes.



**Figura 23.** Estudio histológico a las 24 h. Tinción de H&E. **A.** Control. **B.**  $K_2Cr_2O_7$ . **C.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2-0$ . **D.**  $K_2Cr_2O_7+SnCl_2-12$ . **E.**  $SnCl_2-0$ . **F.**  $SnCl_2-12$ . 200 X. Se observan vacuolas (\*), detritus (▶) y cilindros ialinos (▶) únicamente en los túbulos proximales.



**Figura 24.** Marcadores de daño glomerular: BUN (A) y creatinina en suero (B). Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.



**Figura 25.** Contenido de carbonilos. Prom±E.E.M. n=5. Grupos con diferentes letras indica diferencia entre ellos P<0.001.

## IX. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se caracterizó la IRA por  $K_2Cr_2O_7$  donde el pico de daño en la función tubular es a las 24 h y el de la función glomerular es a las 48 h.
2. El  $K_2Cr_2O_7$  indujo la expresión renal de HO-1, la cual fue menor que en otros modelos de daño renal.
3. Se observó un efecto sinérgico en la inducción de la HO-1 al administrar  $K_2Cr_2O_7$  y  $SnCl_2$ , pero solo cuando se preadministró el  $SnCl_2$ .
4. La preadministración de  $SnCl_2$  disminuyó el daño renal funcional y estructural y el estrés oxidativo en la IRA por  $K_2Cr_2O_7$  a las 24 y 48 h de tratamiento y parece estar relacionado con el aumento de HO-1.
5. Las enzimas antioxidantes Cu,Zn-SOD, Mn-SOD y GR no fueron afectadas por el  $K_2Cr_2O_7$  ni por el  $SnCl_2$ . La CAT disminuyó con el tratamiento de  $K_2Cr_2O_7$  y/o  $SnCl_2$ . La GPx disminuyó a las 48 h de tratamiento con el  $K_2Cr_2O_7$  pero su disminución se previno con la preadministración de  $SnCl_2$ .
6. La protección que confiere el  $SnCl_2$  se pierde por la inhibición de la HO-1, pero esta inhibición no exagera ni el daño ni el estrés oxidativo.
7. Sólo la preinducción (y no la inducción conjunta o posterior) de HO-1 genera un estado de protección en la IRA por  $K_2Cr_2O_7$ .



## X. DISCUSIÓN

El trabajo realizado en esta tesis demuestra que el  $K_2Cr_2O_7$  induce a la HO-1 en riñón de rata y que solo la preinducción de la enzima es capaz de disminuir el daño estructural y funcional y el estrés oxidativo que induce el  $K_2Cr_2O_7$ .

El  $K_2Cr_2O_7$  es un compuesto que induce el daño renal rápidamente, funcionalmente a las 12 h y estructuralmente a las 24 h de tratamiento. La IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$  no provoca en las ratas la disminución en el consumo de agua, pero si disminuye su apetito. Por esta razón las ratas se mantienen en su peso inicial y no aumentan de peso con el tiempo como ocurre normalmente. Es importante registrar el peso de los animales para asegurarnos que su metabolismo no cambie abruptamente, ya que utilizamos productos finales del metabolismo para evaluar el daño renal. Razón por la cual sólo evaluamos la nefrotoxicidad a las 24 y 48 h.

Los marcadores de daño tubular y glomerular no presentaron el pico de daño al mismo tiempo. Esto sugiere que primero se presenta el daño en el túbulo y como consecuencia se presenta el daño en el glomérulo. Además se sabe que el daño en túbulo ocasiona un flujo retrógrado debido a que no se reabsorbe casi nada, provocando una alteración en la función del glomérulo. Es importante aclarar que no se altera el metabolismo y que la acumulación de los productos finales, como la creatinina y la urea, se debe a que no se eliminan eficientemente.

En algunos otros modelos de IRA la HO-1 se induce directa o indirectamente por el insulto que genera la IRA. Respecto al modelo de IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$ , algunos autores informaron que el Cr(VI) no induce a la HO-1. Sin embargo, nosotros encontramos que la inducción de la HO-1 es evidente en las primeras h de tratamiento con el  $K_2Cr_2O_7$  y que esta inducción es apenas perceptible a las 24 h. Es posible que esta inducción tan discreta fuera tomada como negativa o quizás el compuesto de Cr(VI) utilizado ( $Na_2CrO_4$ ) no genera la misma respuesta. Hasta el momento no se conoce el o los mecanismos por los cuales los metales inducen a la HO-1, sin embargo se sabe que no todos lo hacen por lo que existen muchos estudios donde evalúan si diversos metales en diferentes compuestos tienen esta característica. También se sabe que el gen de la HO-1 tiene un sitio de regulación por metales pero se desconoce cuales producen efecto de inducción y si algunos ocasionan inhibición. La inducción que observamos con el  $K_2Cr_2O_7$  desconocemos si es a nivel traduccional o transcripcional, aunque posiblemente sea transcripcional debido a que el tiempo de vida media

del mensajero es de 2.5 min. Sin embargo también es posible que el  $K_2Cr_2O_7$  estabilice el mensaje de la HO-1 aumentando su tiempo de vida media.

Por otro lado el  $SnCl_2$  es un fuerte inductor de la HO-1 en diferentes órganos, incluyendo el riñón y no se conoce cual es su mecanismo de inducción, pero se piensa que puede ser por la presencia del Sn y por que puede causar estrés oxidativo. En este estudio no observamos indicios de estrés oxidativo debidos al  $SnCl_2$ , mejor aún observamos un comportamiento más homogéneo, en los parámetros bioquímicas medidos para evaluar la función renal, en las ratas a las que solo se les administró el  $SnCl_2$ .

Es importante hacer notar que por la presencia de otros metales o en otros modelos de daño renal la inducción que se produce es mucho mayor. En estos casos donde la inducción es grande, la preinducción de la HO-1 genera un estado de protección. Es por lo tanto nuestro modelo de estudio el primero en donde la inducción de la HO-1 es pequeña por parte del nefrotóxico y la preinducción de la misma con un potente inductor es capaz de prevenir el daño. Además la inhibición de la HO previa a la administración de  $K_2Cr_2O_7$  no mostró un daño mayor al observado sólo con  $K_2Cr_2O_7$  lo cual sugiere que la enzima inducida por este compuesto no participa de forma importante en el curso de la IRA por  $K_2Cr_2O_7$ . Una posible explicación podría ser que la cantidad de enzima inducida por el  $K_2Cr_2O_7$  no contribuye en forma importante para evitar el daño inducido por el  $K_2Cr_2O_7$ . Sin embargo es claro que la sobre inducción de esta enzima por el  $SnCl_2$  confiere una prevención apreciable.

La preinducción de la HO-1 con  $SnCl_2$  nos permitió prevenir el daño funcional, estructural y oxidativo que produce el  $K_2Cr_2O_7$ . Otros autores también encontraron que la preinducción de HO-1 con  $SnCl_2$  tiene un efecto protector dependiente de HO-1, por ejemplo en isquemia reperusión (Toda et al., 2002), en hipertrofia cardiaca en hipertensión (Seki et al., 1999) y en inflamación de córnea (Laniado-Schwartzman et al., 1997). Sin embargo el mecanismo exacto por el cual genera la protección no se conoce por completo en ninguno de los modelos de daño oxidativo antes mencionados, incluyendo el del  $K_2Cr_2O_7$ . Pero las evidencias que se tienen de cada modelo no son del todo similares, una evidencia que es consistente en estos modelos es que la inhibición de la HO evita o disminuye la protección que produce la inducción de la HO-1.

En nuestro estudio observamos que es muy importante el momento de la inducción de la HO-1 con respecto a la progresión del daño oxidativo (inducido por  $K_2Cr_2O_7$ ). La preinducción de esta enzima puede generar un estado de protección mientras que la inducción cuando el daño oxidativo está en progreso no evita que el daño continúe. Un caso mas grave

es donde se induce a la HO-1 después de que el daño ya es evidente, lo que ocasiona un daño funcional y estructural mayor. En este caso es posible pesar que el SnCl<sub>2</sub> si genera un nivel de estrés oxidativo que en condiciones celulares normales no causa daño pero es suficiente para inducir a la enzima. Sin embargo, cuando la célula se encuentra en condiciones de toxicidad y de estrés oxidativo, la presencia de un factor estresante adicional, aumenta la disfuncionalidad de la célula y disminuye su capacidad de respuesta a la inducción de la HO-1.

Un hallazgo importante que observamos es que al administrar SnCl<sub>2</sub> y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> con 12 h de diferencia, se genera un efecto sinérgico en la inducción de HO-1. Este efecto puede ser debido a que ambos compuestos tienen diferente mecanismo de inducción. El sinergismo de 2 sustancias en la inducción de HO-1 también lo observaron otros autores. En hepatocitos de pollo hay un sinergismo en la inducción de HO-1 por hierro y glutetimida (Cable et al., 1990), este sinergismo es dependiente del grupo hemo. Por otro el sinergismo de níquel y dietilditiocarbamato (Sunderman, 1987) en la actividad de HO, es atribuido en parte al aumento del contenido intracelular del níquel.

La prevención del daño que observamos con la inducción de la HO-1 a las 24 h se mantiene a las 48 h, pero no de la misma magnitud. Esto podría deberse a que la IRA a las 48 h es más severa al menos glomerularmente y/o a que el efecto del SnCl<sub>2</sub> disminuye porque solo se administró una sola vez 12 h antes del K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y por tanto la cantidad de enzima disminuyó. Estas observaciones también apoyan la teoría que postulamos diciendo que la HO-1 interviene de forma importante en la prevención del daño, ya que 48 h después de la administración del K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> existe aún prevención del daño y presencia de HO-1. Por tanto es posible que se consiga mayor protección hacia las 48 h si se administrara una segunda dosis de SnCl<sub>2</sub>.

Ninguna de las enzimas antioxidantes evaluadas (SOD, GR, CAT y GPX) tuvo un cambio significativo en este estudio. Sin embargo probablemente la participación de SOD y GR consiste en no disminuir por el tratamiento con K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a pesar de la necrosis que se produce. La disminución de GPX debida al K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a las 48 h, se previno al preadministrar el SnCl<sub>2</sub>, lo que sugiere su participación en el estado de protección adquirido. En cambio la catalasa es una enzima que disminuye aún con el SnCl<sub>2</sub>, a pesar de no existir daño renal ni estrés oxidativo detectable. Este disminución de la CAT también podría apoyar la especulación de que el SnCl<sub>2</sub> genera estrés oxidativo ya que la CAT es muy sensible al estrés oxidativo.

En el modelo de IRA por K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> solo se conocía la presencia de estrés oxidativo por la lipoperoxidación. Nosotros evaluamos otros marcadores (proteínas oxidadas y proteínas

nitradas) observando que el daño oxidativo también ocurre en las proteínas. La preinducción de la HO-1 en este modelo mostró que el daño por estrés oxidativo disminuye, sugiriendo que es debido a la enzima, sus productos de reacción y/o la disminución del grupo hemo. La bilirrubina es un producto final de la degradación del grupo hemo (Dennery, 2000; Dennery et al., 2001; Clark et al., 2000), la cual podría disminuir el estrés oxidativo al reaccionar directamente con ERO que se generan por el  $K_2Cr_2O_7$ . El monóxido de carbono liberado al convertir el hemo a biliverdina puede contribuir al reestablecimiento de la depuración de creatinina debido a que es un potente vasodilatador (Dennery, 2000; Suttner y Dennery, 1999). Para comprobar esta hipótesis se puede administrar biliverdina, bilirrubina y monóxido de carbono por separado y evaluar si la IRA por  $K_2Cr_2O_7$  disminuye. Adicionalmente se sabe que la ferritina, la cual almacena hierro libre, en ocasiones se induce cuando la HO-1 está sobreexpresada para almacenar el hierro que libera la reacción de la HO. Por tanto esta también es una forma para evitar el daño por el grupo hemo, cuando este es metabolizado. Por todas las formas de posible protección, antes mencionadas, que puede generar la inducción de la HO-1, se dice que es una respuesta antioxidante de la célula para resistirse al daño.

Cuando administramos el inhibidor de la enzima, no observamos que la reversión del daño fuera completa como lo esperábamos, debido a que es un inhibidor competitivo que se une irreversiblemente. Sin embargo es posible que la dosis administrada no era la suficiente o que la inducción debida al inhibidor competitivo pudo ejercer un efecto benéfico. Otra posibilidad es que el mecanismo de protección que confiere la administración del  $SnCl_2$  no solo es la inducción de la HO-1 y la presencia de sus productos de reacción.

Es importante hacer notar que la reversión del estrés oxidativo prueba que la presencia de la enzima no basta para conferir protección sino que se requiere su actividad, lo que apoya la hipótesis planteada con anterioridad, acerca de que se requiere para disminuir niveles de grupo hemo libre.

## XI. CONCLUSIONES

La HO-1 renal es inducida por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas.

La HO-1 inducida por  $K_2Cr_2O_7$  no tiene un papel protector evidente en la IRA inducida por este compuesto en ratas.

La administración de  $SnCl_2$  induce a la HO-1 y correlaciona dicha inducción con la prevención del daño renal y el estrés oxidativo generados por el  $K_2Cr_2O_7$  en ratas.

El  $SnCl_2$  no tiene un efecto terapéutico en el daño renal inducido por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas.

## XII. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el contenido de grupo hemo libre en tejido y en suero, para conocer la participación de éste en la inducción de la HO-1. La dosis de  $K_2Cr_2O_7$  que se administró a las ratas no produce hemólisis, por tanto, no hay aumento de grupo hemo libre debido a hemólisis. Sin embargo, debido a la necrosis presente es posible que aumente el grupo hemo libre proveniente de hemoproteínas celulares como citocromos o enzimas como la catalasa.
2. Determinar la contribución que tienen cada uno de los productos de la reacción de la HO en la prevención de la IRA inducida por  $K_2Cr_2O_7$  en ratas. Para ello se debe evaluar los niveles de biliverdina, bilirrubina y monóxido de carbono presentes en tejido y en suero. La presencia de los productos de su reacción, indicaría que la HO sí muestra actividad *in vivo*, ya que podría ser activa pero no trabajar por alguna situación, por ejemplo, por ausencia de sustrato.
3. Evaluar la expresión de la ferritina, una proteína que almacena hierro libre. El aumento de ferritina también podría ser un mecanismo que contribuya a la prevención del estrés oxidativo porque de esta manera se evitaría que el hierro libre catalice la reacción tipo Fenton generando ROS.
4. Evaluar si el efecto inductor del  $SnCl_2$  sobre la HO-1 es a nivel del ARN mensajero o de la proteína de la HO-1. Para ello, se puede medir el ARN mensajero de la HO-1 directamente o indirectamente.

5. Investigar si el  $\text{SnCl}_2$  es capaz de aumentar el tiempo de vida media del ARN mensajero de la HO-1 y por tanto, si es un mecanismo para que la inducción por este compuesto sea rápida y tan grande.
6. Se sabe que en este modelo de IRA inducida por  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  las ratas se recuperan entre el día 12 y 13 (datos obtenidos en el laboratorio) y conociendo que el  $\text{SnCl}_2$  disminuye la IRA sería interesante investigar si el  $\text{SnCl}_2$  acorta este período de recuperación (aunque se presente con la misma gravedad) o disminuye la gravedad sin acortar el período de recuperación. Para ello se debe administrar el  $\text{SnCl}_2$  y el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  con el mismo esquema de este trabajo de tesis y seguir el proceso de la IRA hasta la completa recuperación de las ratas.
7. Investigar si una segunda administración del  $\text{SnCl}_2$  puede evitar por completo el daño renal inducido por el  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . Esta segunda administración sería con el fin de no permitir la disminución de la HO-1 como ocurre a las 48 h con una sola administración de  $\text{SnCl}_2$ .
8. Investigar si el  $\text{SnCl}_2$ , que es un potente inductor de la HO-1, puede prevenir el daño en otros modelos de IRA como el inducido por gentamicina donde la inhibición de la actividad de la HO no aumenta el daño y la inducción de HO-1 causada por el antibiótico no es tan grande como la inducida por el  $\text{SnCl}_2$ . Este modelo de gentamicina es semejante en características de daño renal e inducción de HO-1 al del  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  por tanto, es posible que se observe una prevención del daño, lo cual podría tener aplicación clínica.
9. Investigar el mecanismo por el cual el  $\text{SnCl}_2$  y  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  inducen a la HO-1. Algunos de intermediarios de las señales intracelulares que intervienen en la inducción de la HO-1 son el AMPc, el GMPc, las fosfatasa de proteínas, proteínas activadas por mitógenos, proteínas cinasas C, A, G y tirosina cinasa. Este estudio es deseable hacerse *in vitro* en cultivos de células de túbulo proximal de rata (NRK-52E) por la facilidad del control de las condiciones. Con estos resultados podríamos comenzar a entender parte del proceso de inducción.

### XIII. REFERENCIAS

- Abraham NG, Friedland ML, Levere RD. 1983. Heme metabolism in erythroid and hepatic cells. *Prog. Hemat.* 13: 75-130.
- Abraham NG, Levere RD, Freedman ML. 1985. Effect of age on rat liver heme and drug metabolism. *Exp. Gerontol.* 20: 277-284.
- Abraham NG, Lin JHC, Schwartzman ML, Levere RD, Shibahara S. 1988. The physiological significance of heme oxygenase. *Int. J. Biochem.* 20: 543-558.
- Abraham NG, Mitrione SM, Levere RD. 1986. Kinetic and properties of human fetal and adult liver heme oxygenase. *Biochem. Arch.* 2: 253-259.
- Abraham NG, Pinto A, Levere RD, Mullane K. 1987. Identification of heme oxygenase and cytochrome P-450 in the rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19: 73-81.
- Aebi HE. 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105: 121-126.
- Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. 1995. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in rat. *Kidney Int.* 48: 1298-1307.
- Agarwal A, Kim J, Matas AJ., Alam J, Nath KA. 1996. Gas generating systems in acute renal allograft rejection in the rat: co-induction of heme oxygenase and nitric oxide synthase. *Transplantation.* 61: 93-98.
- Agarwal A, Nick HS. 2000. Renal response to tissue injury: Lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 965-973.
- Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. 1990. Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: Reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 595-603.
- Appenroth D, Rost M, Friedrich M, Schulz O. 1996. a Contribution to the mechanism of chromate nephrotoxicity in developing rats: EPR investigations. *Arch. Toxicol.* 71: 25-30.
- Appenroth D, Schulz O, Winnefeld K. 1996. b Riboflavin can decrease the nephrotoxicity effect of chromate in young and adult rats. *Toxicol. Lett.* 87: 47-52.
- Appenroth D, Winnefeld K, 1998. Vitamin E and C in the prevention of metal nephrotoxicity in developing rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 50: 391-396.
- Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. 1991. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* 51: 974-978.
- Arakawa K, Suzuki H, Naitoh M, Matsumoto A, Hayashi K, Matsuda H, Ichihara A, Kubota E, Saruta T. 1996. Role of adenosine in the renal response to contrast medium. *Kidney Int.* 49: 1199-1206.
- Arturson G, Groth T, Grotte G. 1971. Human glomerular basement membrane porosity and filtration pressure: dextran clearance analysed by theoretical models. *Clin. Sci.* 40: 137-158.
- Ausiello DA, Kreisberg JI, Roy C, Karnovsky MJ. 1980. Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. *J. Clin. Invest.* 65: 754-760.
- Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ. 1994. a Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch. Biochem. Biophys.* 309: 239-246.
- Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. 1994. b Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am. J. Physiol.* 266: C365-C367.
- Bagchi D, Hassoun EA, Bagchi M, Stohs SJ. 1995. Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in Sprague-Dawley rats. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 110: 177-187.

- Bakken AF, Thalar MM, Schmid R. 1972. Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity. *J. Clin. Invest.* 51: 530-536.
- Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. 1997. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 29: 465-477.
- Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. 1999. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab. Rev.* 31: 971-997.
- Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. 1991. Exposure of endothelial cells to free heme potenciales damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab. Invest.* 64: 648-655.
- Banci L, Benedetto M, Bertini I, Del Conte R, Piccioli M, Viezzoli MS. 1998. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* 37: 11780-11791.
- Bannister JV, Rotilio G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.
- Barceloux DG. 1999. Chromium. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37: 173-194.
- Baud L, Ardaillou R. 1986. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am. J. Physiol.* 251: F765-F776.
- Baud L, Ardaillou R. 1993. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br. Med. Bull.* 49: 621-629.
- Beck WT, Dedman ML, Ouellette MA. 1982. Biochemical basis for impaired drug metabolism in tumor-bearing rats. Evidence for altered regulation of hepatic microsomal heme protein synthesis. *Biochem. Pharmacol.* 31: 1535-1543.
- Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* C1424-C1437.
- Bencko V. 1985. Chromium: a review of environmental and occupational toxicology. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 29: 37-46.
- Berry JP, Hourdry J, Galle P, Lagrue G. 1978. Chromium concentration by proximal renal tubule cells: an ultrastructural, microanalytical and cytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 26: 651-657.
- Birtwistle RJ, Michel J, Howie AJ, Adu D. 1989. Reactive oxygen products in heterologous antiglomerular basement membrane nephritis in rats. *Br. J. Exp. Pathol.* 70: 207-213.
- Bitar M, Weiner M. 1984. Heme and hemoproteins in streptozotocin-diabetic female rats. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1921-1928.
- Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 240: 500-508.
- Brady HR, Brenner BM, Lieberthal W. 1996. Acute renal failure. En: Brenner B, (ed) *The kidney*. Philadelphia: WB Saunders; 1200-1252.
- Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. 1986. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 528-533.
- Brenner BM. 2000. *The kidney*. W.B. Saunders Company. 6a ed. USA.
- Brigelius-Flohe R, Auman KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F, Wingender E, Flohé L. 1994. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and reduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 269: 7342-7348.
- Buettner GR. 1993. The pecking order of the free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 535-543.



- Burdon RH, Rice-Evans C. 1989. Free radicals and the regulation of the mammalian cell proliferation. *Free Radic. Res. Commun.* 6: 345-358.
- Burk RF. 1991. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J.* 5: 2274-2279.
- Burton GW, Yoyce A, Ingold KU. 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2: 327-329.
- Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M, Carney J. 1998. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-ter-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854: 448-462.
- Butterfield LH, Merino A, Golub SH, Shau H. 1999. From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal.* 1: 385-402.
- Cable E, Greene Y, Healey J, Evans CO, Bonkovsky H. 1990. Mechanism of synergistic induction of hepatic heme oxygenase by glutethimide and iron: studies in cultured chick embryo liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 176-181.
- Cantley L, Spokes K, Clark B, McMahon EG, Carter J, Epstein FH. 1993. Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction. *Kidney Int.* 44: 1217-1223.
- Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250: 5475-5480.
- Chae HZ, Kang SW, Rhee SG. 1999. a Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.* 300: 219-226.
- Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. 1999. b Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 45: 101-112.
- Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemeermann C. 2000. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.* 58: 658-6573.
- Cheng L, Kellogg EW 3rd, Packer L. 1981. Photoinactivation of catalase. *Photochem. Photobiol.* 34: 125-129.
- Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. 1993. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx- GI. *J. Biol. Chem.* 268: 2571-2576.
- Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. 2000. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem. J.* 3: 615-619.
- Clough D, Bunger R. 1995. Protection by pyruvate against inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>- ATPase by a free radical generating system containing t-butylhydroperoxide. *Life Sci.* 57: 931-943.
- Corey EJ, Mehrotra MM, Khan AU. 1987. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 842-846.
- Cruse I, Maines MD. 1988. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J. Biol. Chem.* 263: 3348-3353.
- Da Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabaawy HE, Lianos E, Abraham NG. 2001. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the kidney. *Kidney Int.* 59: 1448-1457.
- Danovitch G, Carvounis C, Weinstein E, Levenson S. 1979. Non-oliguric acute renal failure. *J. Med. Sci.* 15: 5-8.

- Dartsch PC, Hildenbrand S, Kimmel R, Schmahl FW. 1998. Investigations on the nephrotoxicity and hepatotoxicity of trivalent and hexavalent chromium compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71: S40-S45.
- Datta PK, Koukouritaki SB, Hopp KA, Lianos EA. 1999. Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2540-2550.
- Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. 1986. Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235: 747-754.
- Davis CA, Nick HS, Agarwal A. 2001. Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2683-2690.
- De Flora S, Wetterhahn KE. 1989. Mechanism of chromium (VI) metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.* 7: 169-244.
- De Tata V, Bombara M, Novelli M, Pingitore R, Bergamini E. 1998. Glycated plasma proteins in experimentally induced acute toxic renal failure by dichromate injection: evidence for loss with urine and decreased plasma levels. *Int. J. Exp. Pathol.* 79: 141-149.
- Deen WM. 1982. The glomerular barrier to macromolecules: Theoretical and experimental considerations. En: Brenner BM, Stein JH (eds) *Nephrotic Syndrome. Contemporary issues in Nephrology.* Vol. 9 New York, Churchill Livingstone. 1-20.
- Dees LI, Topchishrili GI, Akahalaia MI, Platonov AG. 1985. Effect of X-ray irradiation on the activity of key enzymes in heme biosynthesis and breakdown in the rat liver. *Bull. Exp. Biol. Med.* 99: 681-683.
- DeMatteis F, Gibbs AH, Harvey C. 1985. Studies on the inhibition of ferrochelatase by N-alkylated dicarboxylic porphyrins. Steric factors involved and evidence that the inhibition is reversible. *Biochem. J.* 226: 537-544.
- Dennery PA, Weng YH, Stevenson DK, Yang GJ. 2001. The biology of bilirubin production. *J. Perinatol.* 21: S17-S20.
- Dennery PA. 2000. Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr. Top. Cell. Regul.* 36: 181-199.
- Dieterich HJ, Barrett JM, Kriz W, Bulhoff JP. 1975. The ultrastructure of thin loop limbs of the mouse kidney. *Anat. Embryol.* 147: 1-18.
- Dishart MK, Kellum JA. 2000. An evaluation of pharmacological strategies for the prevention and treatment of acute renal failure. *Drugs* 59: 79-91.
- Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. 2000. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol. Cell Biochem.* 205: 1-11.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 1997. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.* 151: 1205-1203.
- Drummond GS, Kappas A. 1986. Sn-protoporphyrin inhibition of fetal and neonatal brain heme oxygenase. Transplacental passage of the metalloporphyrin and prenatal suppression of hyperbilirubinemia in the newborn animals. *J. Clin. Invest.* 77: 971-976.
- Edelstein CL, Schrier RW. 1995. The role of calcium in cell injury. En: Golgorsky MS, ed. *Contemporary issues in nephrology.* New York: Churchill Livingstone. 1-21.
- Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL. 1998. Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273: 8922-8931.
- Ellis EN, Brouhard BH, Lynch RE, Dawson EB, Tisdell R, Nichols MM, Ramirez F. 1982. Effects of hemodialysis and dimercaprol in acute dichromate poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 19: 249-258.

- Evan AP, Dail WG. 1974. The effects of sodium chromate on the proximal tubules of the rat kidney. Fine structural damage and lysozymuria. *Lab. Invest.* 30: 704-715.
- Florence T.M. 1990. Free radicals, antioxidants and cancer prevention. *Proc. Nutr. Soc. Aust. Annu. Conf.* 15: 88-93.
- Fogo A, Hellings S, Inagami T, Kon V. 1992. Endothelin receptor antagonism is protective in vivo in acute cyclosporine toxicity. *Kidney Int.* 42: 770-774.
- Fong KL, McCay PB, Poyer JL. 1976. Evidence for superoxide-dependent reduction of  $Fe^{3+}$  and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation. *Chem. Biol. Interact.* 15: 77-89.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4533-4537.
- Franchini I, Mutti A, Cavatorta A, Corradi A, Cosi A, Olivetti G, Borghetti A. 1978. Nephrotoxicity of chromium. Remarks on an experimental and epidemiological investigation. *Contrib. Nephrol.* 10: 98-110.
- Freeman BD. 1984. Biological sites and mechanisms of free radical production. En: *Free radicals molecular biology, aging, and disease.* Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slater TE. (eds). Raven, New York, 43-52.
- Frei B, Stocker R, England L, Ames B. 1990. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv. Exp. Med. Biol.* 264: 155-163.
- Fridovich I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 147-159.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203-1209.
- Fridovich I. 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893: 13-18.
- Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, Simone J, Goligorsky MS. 1993. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 264: F149-F157.
- Gibson DD, Hawrylko J, McCay BP. 1985. GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids* 20: 704-711.
- Granados-Silvestre A. 1999. Efecto del ajo en polvo sobre el síndrome nefrótico y la hipertensión. Tesis de maestría en ciencias (Bioquímicas), Facultad de Química UNAM.
- Gregory EM, Fridovich I. 1973. Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *J. Bacteriol.* 114: 543-548.
- Griffiths HR, Unsworth J, Blake DR, Lunec J. 1988. Free radicals in chemistry, pathology and medicine. Richelieu, London, 439-454.
- Gumbleton M, Nicholls PJ. 1988. Dose-response and time-response biochemical and histological study of potassium dichromate-induced nephrotoxicity in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 26: 37-44.
- Ha HC, Thiagalingam A, Nelkin BD, Casero RA Jr. 2000. Reactive oxygen species are critical for the growth and differentiation of medullary thyroid carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 6: 3783-3787.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 2001. Free radicals in biology and medicine. 3a edición. Oxford University Press. USA. 36-104.
- Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human diseases. *Am. J. Med.* 91: 14S-22S.
- Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31: 261-272.

- Hamdi IÖ, Balk M, Aksoy Y, Müftüoğlu M, Özer N. 1998. The effects of oxidative stress on the redox system of the human erythrocyte. En: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. Özben T. ed. Plenum Press. USA. 25-49.
- Harris D.E. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6: 2675-2683.
- Harris LR, Cake MH, Macey DJ. 1994. Iron release among ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs from vertebrates. *J. Biochem.* 301: 385-389.
- Hebbel RP, Eaton JW. 1989. Pathobiology of heme interaction with the erythrocyte membrane. *Semin. Hematol.* 26: 136-149.
- Heinz VMD. 1983. Renal Function: Mechanism Preserving Fluid and Solute Balance in Health. 2nd edition. Little, Brown and Company. USA. 1-10.
- Hirotsu S, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, Hakoshima T. 1999. Crystal structure of multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 12333-12338.
- Hojo Y, Satomi Y. 1991. In vitro nephrotoxicity induced in mice by chromium (VI): involvement of glutathione and chromium (V). *Biol. Trace Element Res.* 31: 21-31.
- Hsieh Y, Tu C, Bratt PJ, Angerhofer A, Lepock JR, Hickey MJ, Tainer JA, Nick HS, Silverman DN. 1998. Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry* 37: 4731-4739.
- Huang YL, Chen CY, Sheu JY, Chuang IC, Pan JH, Lin TH. 1999. Lipid peroxidation in workers exposed to hexavalent chromium. *J. Toxicol. Environ. Health* 56: 235-247.
- Huberman A. 1995. Biología de los radicales de oxígeno En: Bioquímica. Díaz ZJC, Hicks GJJ (eds). Interamericana-McGraw-Hill, México DF.
- Hughes AK, Stricklett PK, Padilla E, Kohan DE. 1996. Effect of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells. *Kidney Int.* 49: 181-189.
- Hynder RA, Stein HJ. 1991. Oxygen-derived free radicals. *Arch. Surg.* 126: 104-115.
- Iqbal J, Whitney P. 1991. Use of cyanide and diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic. Biol. Med.* 10: 69-77.
- Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. 1993. Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Invest.* 69: 261-274.
- Jennette KW. 1981. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. *Environ. Health Perspect.* 40: 233-252.
- Jones DB. 1977. Correlative scanning and transmission electron microscopy of glomeruli. *Lab. Invest.* 37: 569-578.
- Jones P, Kortenkamp A, O'Brien P, Wang G, Yang G. 1991. Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium (V) intermediate isolated from the reaction of chromate with glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 652-655.
- Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. 1975. New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin. Chem.* 21: 1136-1140.
- Jung K, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. 1991. Methods compared for determining activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme* 45: 215-221.
- Kaissling B, Kriz W. 1979. Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 56: 1-123.
- Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A. 1988. Depression of membrane-bound Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.* 254: C330-C337.
- Kaloyanides GJ, Pastoriza-Muñoz E. 1980. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int.* 18: 571-582.

- Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. 1998. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 273: 6297-6302.
- Karam H, Bruneval P, Clozel JP, Loffler BM, Bariety J, Clozel M. 1995. Role of endothelin in acute renal failure due to rhabdomyolysis in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274: 481-486.
- Katz AI, Doucet A, Morel F. 1979. Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat, and mouse nephron. *Am. J. Physiol.* 237: F114- F120.
- Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, Imai E, Hori M. 1999. Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 56: 1004-1013.
- Kawaguchi M, Yamada M, Wada H, Okigaki T. 1992. Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury in vitro caused by puromycin aminonucleoside. *Toxicology* 72: 329-340.
- Kawanishi S, Inoue S, Sano S. 1986. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 261: 5952-5958.
- Kelly KJ, Tolckoff-Rubin NE, Rubin RH, Williams WW Jr, Meehan SM, Meschter CL, Christenson JG, Bonventre JV. 1996. An oral platelet activating factor antagonist, Ro-24-4736, protects the rat kidney from ischemic injury. *Am. J. Physiol.* 271: F1061-F1067.
- Keyse S, Tyrrell R. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 99-103.
- Khan AU, Kasha M. 1994. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12365-12367.
- Kikuchi G, Yoshida T. 1983. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol. Cell. Biochem.* 53/54: 163-183.
- Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Kang SW, Rhee SG, Soini Y. 2002. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J. Pathol.* 196: 316-323.
- Kirkman HN, Gaetani GF. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4343-4347.
- Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. 1999. Mechanism of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 274: 13908-13914.
- Kirschbaum BB, Sprinkel FM, Oken DE. 1981. Proximal tubule brush border alterations during the course of chromate nephropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 58: 19-30.
- Krinsky NI, Deneke SM. 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J. Natl. Cancer Inst.* 69: 205-209.
- Kurtz SM, Feldman JD. 1962. Experimental studies on the formation of the glomerular basement membrane. *J. Ultrastruc. Res.* 6: 19-76.
- Laborda R, Diaz-Mayans J, Núñez A. 1986. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of chromium compounds in rats. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 36: 332-336.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laniado-Schwartzman M, Abraham NG, Connors M, Dunn MW, Levere RD, Kappas A. 1997. Heme oxygenase induction with attenuation of experimentally induced corneal inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 53: 1069-1075.
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958.

- Lee SP, Hwang YS, Kim YJ, Kwon KS, Kim HJ, Kim K, Chae HZ. 2001. Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 276: 29826-29832.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AC, Ahn B-W, Shaltiel S, Stadtman ER. 1996. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464-478.
- Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM. 2002. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Circ. Res.* 90: 143-150.
- Lieberthal W. 1997. Biology of acute renal failure: therapeutic implications. *Kidney Int.* 52: 1102-1115.
- Lieberthal W, Nigam SK. 1998. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal distal tubular injury. *Am. J. Physiol.* 275: F623-F631.
- Liu KJ, Shi X. 2001. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol. Cell Biochem.* 222: 41-47.
- Llesuy S.F., Tomaro M.L. 1994. Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1123: 9-14.
- Lockwood TD, Bosmann HB. 1979. The use of urinary N-acetyl-b-glucosanimidase in human renal toxicology. I. Partial biochemical characterization and excretion in humans and release from the isolated perfused rat kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49: 323-336.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luo GM, Qi DH, Zheng YG, Mu Y, Yan GL, Yang TS, Shen JC. 2001. ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Lett.* 492: 29-32.
- MacMillan-Crow LA, Thompson JA. 1999. Immunoprecipitation of nitrotyrosine-containing proteins. *Methods Enzymol.* 301: 135-145.
- Madsen KM. 1980. Mercury accumulation in kidney lysosomes of proteinuric rats. *Kidney Int.* 18: 445-453.
- Magee CC, Azuma H, Knoflach A, Denton MD, Chandraker A, Iyer S, Buelow R, Sayegh M. 1999. In vitro and in vivo immunomodulatory effects of RDP1258, a novel synthetic peptide. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1997-2005.
- Maines MD. 1984. New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. *Crit. Rev. Toxicol.* 12: 241-314.
- Maines MD. 1998. Heme oxygenase: function, multiplicity mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2: 2557-2568.
- Maines MD, Abraham NG, Kappas A. 1977. Solubilization and partial purification of heme oxygenase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 252: 5900-5903.
- Maines MD, Kappas A. 1975. Cobalt stimulation of heme degradation in the liver: Dissociation of microsomal oxidation of heme from cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 250: 4171-4177.
- Maines MD, Kappas A. 1977. Regulation of cytochrome P450-dependent microsomal drug metabolizing enzymes by nickel, cobalt and iron. *Clin. Pharm. Ther.* 22: 780-790.
- Maines MD, Mayer RD, Ewing JF, McCoubrey WK Jr. 1993. Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 457-462.
- Maines MD, Panahian N. 2001. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv. Exp. Med. Biol.* 502: 249-272.

- Maines MD. 1988. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2: 2557-2568.
- Maines MD. 1992. Heme oxygenase: En clinical application and functions. Boca Raton, FL: CRC Press. 226-300.
- Maines MD. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554.
- Marklund SL. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7634-7638.
- Maser RL, Vassmer D, Magenheimer BS, Calvet JP. 2002. Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 991-999.
- Maunsbach AB. 1966. Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney, comparison of results from phase contrast, fluorescence and electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 16: 197-238.
- May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by the thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 273: 23039-23045.
- McCoubrey WKJr, Cooklis MA, Maines MD. 1995. The structure, organization and differential expression of the rat gene for biliverdin reductase. *Gene* 160: 235-240.
- McCoubrey WKJr, Ewing JF, Maines MD. 1992. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 13-20.
- McCoubrey WKJr, Huang TJ, Maines MD. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 247: 725-732.
- McCoubrey WKJr, Maines MD. 1994. The structure, organization, and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* 139: 155-161.
- Miyajira H, Hewitt WR, Cote MG, Plaa GL. 1983. Relationships between histological and functional indices of acute chemically induced nephrotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3: 543-551.
- Mori H, Otake T, Moritomo M, Ueba N, Kunita N, Nakagami T, Yamasaki N, Taji S. 1991. In vitro anti-human immunodeficiency virus type-1 activity of biliverdin, a bile pigment. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 755-757.
- Mosley K, Wembridge DE, Cattell V, Cook HT. 1998. Heme oxygenase is induced in nephrotoxic nephritis and hemin, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. *Kidney Int.* 53: 672-678.
- Motterlini R, Vandergriff KD, Winslow R. 1996. Hemoglobin-nitric oxide interactions and its implications. *Transfus. Med. Rev.* 10: 77-84
- Murav'ev RA, But PG, Fomina VA, Rogovin VV. 2002. The mechanism of bactericidal activity in phagosomes of neutrophils. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 4: 437-441.
- Murphy LM, Strange RW, Hasnain SS. 1997. A critical assesment of the evidence from XAFS and crystallography for the breakage of the imidazolate bridge during catalysis in CuZn superoxide dismutasa. *Structure* 5: 371-379.
- Mustacich D, Powis G. 2000. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 346: 1-8.
- Na KJ, Jeong SY, Lim CH. 1992. The role of glutathione in the acute nephrotoxicity of sodium dichromate. *Arch. Toxicol.* 66: 646-651.
- Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. 1992. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J. Clin. Investt.* 90: 267-270.

- Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. 1996. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int.* 50: 1032-1043.
- Nath KA, Grande JP, Croatt AJ, Likely S, Hebbel RP, Enright H. 1998. Intracellular targets in heme protein-induced renal injury. *Kidney Int.* 53: 100-111.
- Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J. 2000. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am. J. Pathol.* 156: 1527-1535.
- Nath KA, Norby SM. 2000. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med.* 109: 665-678.
- Nath KA. 1994. The functional significance of the induction of heme oxygenase by oxidative stress. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 461-463.
- Nordberg J, Arnér E. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1287-1312.
- Nyengaard JR, Bendtsen TF. 1992. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight and body surface in normal man. *Anat. Rec.* 232: 194-201.
- O'Brien P, Barrett J, Swanson F. 1985. Chromium (V) can be generated in the reduction of chromium (VI) by glutathione. *Inorg. Chim. Acta* 108: 19-20.
- O'Brien P, Kortenkamp A. 1994. Chemical models important in understanding the way in which chromate can damage DNA. *Environ. Health Perspect.* 102: 3-10.
- Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105: 457-464.
- Oberley TD, Verwiebe E, Zhong W, Kang SW, Rhee SG. 2001. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 412-424.
- Ohta K, Yachie A, Fujimoto K, Kaneda H, Wada T, Toma T, Seno A, Kasahara Y, Yokoyama H, Seki H, Koizumi S. 2000. Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. *Am. J. Kidney Dis.* 35: 863-870.
- Olinescu R, Smith T. 2002. Free radicals in medicine. Nova Science Publishers. USA. 11-34.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. 1996. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.* 75: 617-636.
- Ozbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B, Ozbek M. 2000. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int.* 85: 742-746.
- Pedraza-Chaverrí J, Cruz C, Larriva-Sahd J, Juárez RM, Orozco H, Hernández-Pando R, Tapia E. 1995. a Angiotensin I converting enzyme in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Ren. Fail.* 17: 365-375.
- Pedraza-Chaverrí J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 1999. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 245-253.
- Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi I, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 602-11.
- Pedraza-Chaverrí J, Moreno-Muñiz SI, Cruz C, Hernández-Pando R, Larriva-Sahd J, Tapia E. 1995. b Urinary Angiotensin I-converting enzyme activity is increased in experimental acute renal failure. *Clin. Invest. Med.* 18: 424-434.
- Pedraza-Chaverrí J, Tapia E, Bobadilla N. 1992. Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the spin-trapping agent  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Ren. Fail.* 14: 467-471.
- Peresleni T, Noiri E, Bahou WF, Goligorsky MS. 1996. Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *Am. J. Physiol.* 270: F971-F977.



- Pimstone NR, Engel P, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, Schmid R. 1971. Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. *J. Clin. Invest.* 50: 2042-2050.
- Pourahmad J, O'Brien PJ. 2001. Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 500: 203-207.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296: 295-309.
- Radermacher J, Forstermann U, Frolich JC. 1990. Endothelium-derived relaxing factor influences renal vascular resistance. *Am. J. Physiol.* 259: F9-F17.
- Raju VS, McCoubrey WKJr, Maines MD. 1997. Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim. Biophys. Acta* 1351: 89-104.
- Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG, Ward PA. 1984. Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab. Invest.* 51: 396-403.
- Ren B, Huang W, Akesson B, Ladenstein R. 1997. The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 268: 869-885.
- Reznick A, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233: 357-363.
- Rhodin JAG. 1971. Structure of the kidney. En *Diseases of the kidney*, 2a ed. MB Strauss y LG Welt. Little Brown and Co., Boston 35-80.
- Rice-Evans CA. 1994. Formation of the free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes y pathological status. En: *Free radicals and its control*. Rice-Evans A.C. y Burdon R.H. (ed). Elsevier Science. USA. 131-135.
- Rieger JM, Shah AR, Gidday JM. 2002. Ischemia-reperfusion injury of retinal endothelium by cyclooxygenase and xanthine oxidase-derived superoxide. *Exp. Eye Res.* 74: 493-501.
- Ross D, Moldeus P. 1991. Antioxidant defense systems and oxidative stress. En: *Membrane Lipid Oxidation*. Vigo-Pelfrey C. (ed). Boca Raton, FL: CRC, vol 2. 151-70.
- Rotenberg MO, Maines MD. 1990. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 254: 7501-7506.
- Rovin BH, Wurst E, Kohan DE. 1990. Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int.* 37: 1509-1514.
- Rudnick MR, Berns JS, Cohen RM, Goldfarb S. 1996. Contrast media-associated nephrotoxicity. *Curr. Opin. Nephrol. Hyper.* 5: 127-133.
- Ruegg HE, Gandolfi AJ, Nagle RB, Brendel K. 1987. Differential patterns of injury to the proximal tubule of renal cortical slices following in vitro exposure to mercury chloride, potassium dichromate, or hypoxic conditions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 90: 261-273.
- Sánchez L. 1993. Insuficiencia renal aguda. Aspectos clínicos. En: *Tratado de nefrología*. Martínez M, Rodicio J, Herrera J. (ed). Ediciones Norma. 2ª edición. Madrid. 548-588.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* 11: 173-186.
- Scapaginini G, D'Agata V, Calabrese V, Pascale A, Colombrita C, Alkon D, Cavallaro S. 2002. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* 954: 51-59.
- Schacter BA, Kurz P. 1986. Alterations in microsomal drug metabolism and heme oxygenase activity in isolated hepatic parenchymal and sinusoidal cells in Murphy-Sturn lymphosarcoma-bearing rats. *Clin. Invest. Med.* 9: 150-155.
- Schnellman RG, Williams SW. 1998. Proteases in cell death. *Ren. Fail.* 20: 679-686.

- Schwarz MM, Venkatachalam MA. 1974. Structural differences in thin limbs of Henle. Physiological implications. *Kidney Int.* 6: 193-208.
- Seki T, Naruse M, Naruse K, Yoshimoto T. 1999. Induction of heme oxygenase produces load-independent cardioprotective effects in hypertensive rats. *Life Sci.* 65: 1077-1086.
- Sengupta T, Chattopadhyay D, Ghosh N, Maulik G, Chatterjee GC. 1992. Impact of chromium on lipoperoxidative processes and subsequent operation of the glutathione cycle in rat renal system. *Indian J. Biochem. Biophys.* 29: 287-290.
- Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. 1985. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1: 117-124.
- Sharma BK, Singhal PC, Chugh KS. 1978. Intravascular haemolysis and acute renal failure following potassium dichromate poisoning. *Postgrad. Med. J.* 54: 414-415.
- Shi X, Dalal NS. 1989. Chromium (V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium (VI). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 627-634.
- Shibahara S, Müller R, Taguchi H, Yoshida T. 1985. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7865-7869.
- Shibahara S, Yoshida T, Kikuching G. 1979. Mechanism of increase of heme oxygenase activity induced by hemin in cultured pig alveolar macrophage. *Arch. Biochem. Biophys.* 197: 607-617.
- Shibahara S, Yoshizawa M, Suzuki H, Takeda K, Meguro K, Endo K. 1993. Functional analysis of cDNA for two types of human heme oxygenase and evidence for their separate regulation. *J. Biochem.* 113: 214-218.
- Shimizu H, Takahashi T, Suzuki T, Yamasaki A, Fujiwara T, Odaka Y, Hirakawa M, Fujita H, Akagi R. 2000. Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit. Care Med.* 28: 809-817.
- Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A, 2000. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am. J. Physiol.* 278: F726-F736.
- Singh I, Gulati S, Orak JK, Sigh AK. 1993. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol. Cell Biochem.* 125: 97-104.
- Solangi K, Sacerdoti D, Goodman AI, Schwartzman ML, Abraham NG, Levere RD. 1988. Differential effects of partial hepatectomy on hepatic and renal heme and cytochrome P450 metabolism. *Am. J. Med. Sci.* 296: 387-391.
- Stadtman ER, Berlett BS. 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.* 30: 225-243.
- Standeven AM, Wetterhahn KE. 1989. Chromium (VI) toxicity: uptake, reduction and DNA damage. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8: 1275-1283.
- Stanton BA, Biemesderfer D, Wade JB, Giebisch G. 1981. Structural and functional study of the rat distal nephron: Effects of potassium adaptation and depletion. *Kidney Int.* 19: 36-48.
- Stocker R, Yamamoto Y, MaDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-1046.
- Stocker R. 1990. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* 9: 101-112.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- Stone DK, Seldin DW, Kokko JP, Jacobson HR. 1983. Anion dependence of rabbit medullary collecting duct acidification. *J. Clin. Invest.* 71: 1505-1508.

- Sugden KD, Stearns DM. 2000. The role of chromium (V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19: 215-230.
- Sugiyama M. 1992. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.* 2: 397-407.
- Sunderman FW Jr. 1987. Metal induction of heme oxygenase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 514: 65-80.
- Suttner DM, Dennerly PA. 1999. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* 13: 1800-1809.
- Takano S, Aramaki Y, Tsuchiya S. 2001. Lipoxygenase may be involved in cationic liposome-induced macrophage apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 116-120.
- Tandon SK, Behari JR, Kachru DN. 1979. Distribution of chromium in poisoned rats. *Toxicol.* 13: 28-34.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61: 748-755.
- Tisher CC, Bulger RE, Trump BF. 1966. Human renal ultrastructure. I. Proximal tubule of healthy individuals. *Lab. Invest.* 15: 1357-1394.
- Tisher CC, Madsen KM. 2000. Anatomy of the kidney. En *The kidney*. Brenner BM & Rector FC Jr. Brenner (ed) Saunders Co., Philadelphia. 3-67.
- Toda, N.; Takahashi, T.; Mizobuchi, Z.; Fujii, H.; Nakahira, K.; Takahashi, S.; Yamashita, M.; Morita, K.; Hirakawa, M. 2002. Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit. Care Med.* 30: 1512-1522.
- Trachman H., Del Pizzo R., Futterweit S., Levine D., Rao P.S., Valderrama E., Sturman J.A. 1992. Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *Am. J. Physiol.* 262: F117-F123.
- Túri S, Németh I, Torkos A, Sággy L, Varga I, Matkovics B, Nagy J. 1997. Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 161-168.
- Urbanski NK, Beresewicz A. 2000. Generation of \*OH initiated by interaction of Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>+</sup> with dioxygen; comparison with the Fenton chemistry. *Acta Biochim. Pol.* 47: 951-962.
- Vacharajani TJ; Work J, Issekutz AC, Granger DN. 2000. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am. J. Physiol.* 278: H1613-H1617.
- Veltman JC, Maines MD. 1985. Sex difference in adrenal heme and cytochrome P450 metalism. Evidence for the repressive regulation role of testosterone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235: 71-75.
- Vercellotti GM, Balla G, Balla J, Nath K, Eaton JW, Jacob HS. 1994. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 207-213.
- Vogt BA, Alam J., Croatt A.J., Vercellotti G.M., Nath K.A. Acquired to acute oxidative stress. 1995. Possible role of heme oxygenase and ferritin. *Lab. Invest.* 72: 474-483.
- Vogt BA, Shanley TP, Croatt A, Alam J, Johnson KJ, Nath KA. 1996. Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. *J. Clin. Invest.* 98: 2139-2145.
- Wagener FA, Da Silva JL, Farley T, De Witte T, Kappas A, Abraham NG. 1999. Differential effects of heme oxigenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 416-423.
- Wedeen RP, Qian L. 1991. Chromium-induced kidney disease. *Environ. Health Perspect.* 92: 71-74.

- Weisiger RA, Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248: 4793-4796.
- Welling LW, Welling DJ. 1975. Surface areas of brush border and lateral cell walls in the rabbit proximal nephron. *Kidney Int.* 8: 343-348.
- Woodhall PB, Tisher CC. 1973. Response of the distal tubule and cortical collecting duct to vasopresin in the rat. *J. Clin. Invest.* 52: 3095-3108.
- Xie Y, Zhuang ZX. 2001. Chromium (VI)-induced production of reactive oxygen species, change of plasma membrane potential and dissipation of mitochondria membrane potential in chinese hamster lung cell cultures. *Biomed. Environ. Sci.* 14: 199-206.
- Yamaguchi T, Horio F, Hashizume T, Tanaka M, Ikeda S, Kakinuma A, Nakajima H. 1995. Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 11-19.
- Yoneya R, Ozasa H, Nagashima Y, Koike Y, Teraoka H, Hagiwara K, Horikawa S, 2000. Hemin pretreatment ameliorates aspects of the nephropathy induced by mercuric chloride in the rat. *Toxicol. Lett.* 116: 223-229.
- Yoshida T, Sassa S, Kappas A. 1982. Purification and properties of bovine spleen heme oxygenase. Amino acid composition and sites of action of inhibitors of heme oxidation. *J. Biol. Chem.* 257: 7778-7785.
- Yoshida T, Takohashi S, Kikuchi G. 1974. Partial purification of the oxygenase system from pig spleen microsomes. *J. Biochem.* 75: 1187-1191.
- Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. 1991. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J. Biochem.* 109: 918-923.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.
- Yuceyar S, Gumustas K, Erturk S, Hamzaoglu IH, Uygun N, Ayaz M, Cengiz A, Kafadar Y. 1998. The role of oxygen free radicals in acute renal failure complicating obstructive jaundice: an experimental study. *HPB Surg.* 10: 387-393.
- Zentella M, Saldaña Y. 1996. Papel fisiológico de los radicales libres. *Biol. Educ. Bioq.* 15: 152-161.
- Zentella P, Corona G, Saldaña B. 1994. Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *BEB* 13: 87-93.
- Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HW, Lin MC, Fung PC, Kung H, Jin DY. 2000. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 921-927.

## HO-1 INDUCTION ATTENUATES RENAL DAMAGE AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY $K_2Cr_2O_7$

DIANA BARRERA,\* PERLA D. MALDONADO,\* OMAR N. MEDINA-CAMPOS,\* ROGELIO HERNÁNDEZ-PANDO,<sup>†</sup>  
MARÍA E. IBARRA-RUBIO,\* and JOSÉ PEDRAZA-CHAVERRÍ\*

\*Department of Biology, School of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico; and <sup>†</sup>Department of Experimental Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán,” Mexico City, Mexico

(Received 20 November 2002; Revised 16 January 2003; Accepted 30 January 2003)

**Abstract**—Heme oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme in the degradation of heme; its inducible isozyme HO-1 protects against some types of acute tissue injury. The expression and functional role of HO-1 in rats with renal injury induced by potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ) was investigated in this work. Rats were studied 24 h after a single injection of  $K_2Cr_2O_7$ . To address the possible protective effect of HO-1 in this experimental model, this enzyme was induced by an injection of stannous chloride ( $SnCl_2$ ) 12 h before  $K_2Cr_2O_7$  administration. The functional role of HO-1 in  $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$ -treated animals was tested by inhibiting HO activity with an injection of zinc (II) protoporphyrin IX (ZnPP) 18 h before  $K_2Cr_2O_7$ . In  $K_2Cr_2O_7$ -treated rats: (i) renal HO-1 content, measured by Western blot, increased 2.6-fold; and, (ii) renal nitrotyrosine and protein carbonyl content, markers of oxidative stress, increased 3.5- and 1.36-fold, respectively. Renal damage and oxidative stress were ameliorated and HO-1 content was increased in the  $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  group. The attenuation of renal injury and oxidative stress was lost by the inhibition of HO activity in  $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  + ZnPP-treated animals. Our data suggest that HO-1 overexpression induced by  $SnCl_2$  is responsible for the attenuation of renal damage and oxidative stress induced by  $K_2Cr_2O_7$ . © 2003 Elsevier Inc.

**Keywords**—Heme oxygenase, Potassium dichromate, Stannous chloride, Tin chloride, Zinc (II) protoporphyrin IX, Nitrotyrosine, Protein carbonyl, Acute renal failure, Oxidative stress, Nephrotoxicity, Free radicals

### INTRODUCTION

Heme oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme in heme catabolism. HO catalyzes the oxidative cleavage of heme group to biliverdin, carbon monoxide, and iron [1–3]. Biliverdin is subsequently converted to bilirubin by bilirubin reductase [1,2]. To date, three isoforms, products of three distinct genes, have been identified. HO-3 is the newly described one and its mRNA has been detected in many tissues, including the kidney [4]. There are new evidences suggesting that HO-3 represents a rat species-specific, retrotransposed pseudogene [5]. HO-2 is constitutively expressed and localized primarily in the brain, testis, spleen, and kidney [1,6,7]. HO-1 is the inducible isoform with widespread tissue distribution,

including lung, liver, and kidney [1,2,8–10]. HO-1 is induced by a variety of stimuli including hydrogen peroxide, UV radiation, endotoxin, cytokines, glutathione depletion, and some metals [1,10,11]. One pathway common to most of these stimuli is oxidative stress [1,12–14]. Then, the expression of HO-1 in circumstances of stress represents an adaptive response that mitigates the severity of oxidative damage [1,12–14]. HO-1 preinduction [15–17], HO-1 inhibition [15,17], HO-1 gene transfer [18,19], and the use of transgenic mice deficient in HO-1 [20–23] have been used to show the functional role of this enzyme in acute cytotoxicity induced by heme proteins [15,20], hypoxia [21], acute nephrotoxicity [16,17,23], and oxidant injury and inflammation [18,19]. However, HO-1 does not have a protective role in all cases [17,24], and even the overexpression of this enzyme is toxic in some circumstances [24,25].

$K_2Cr_2O_7$  is a chemical compound that is widely used in metallurgy, chrome plating, the chemical industry,

Address correspondence to: Dr. José Pedraza-Chaverrí, Facultad de Química, Ciudad Universitaria UNAM, Edificio B, Segundo Piso, Lab 209, 04510 México D.F., México; Tel: +52 55-5622-3515; Fax: +52 55-5622-3515; E-Mail: pedraza@servidor.unam.mx.

textile manufacture, wood preservation, photography and photoengraving, the refractory and stainless steel industries, and cooling systems [26]. Occupational exposure to chromium has been associated with welders, chrome-plating workers, and chromium pigment factory workers [27]. Chromium is known to cause allergic dermatitis [28], carcinogenicity [29], and acute renal failure (ARF) in humans [27,30,31] and in animals [32–34]. ARF induced by  $K_2Cr_2O_7$  has been used as a model to study the pathophysiology of this disease [33,34]. Acute exposure to Cr(VI) has been reported to produce acute necrosis of renal tubules [35] and renal lipoperoxidation in humans [36]. The data suggest that reactive oxygen species (ROS) are involved in chromium(VI)-induced cell injuries [37–40]. Chromium reduction intermediates [Cr(V), Cr(IV), Cr(III)] may be toxic since they involve the production of ROS [41–43], which may be generated during physiological conditions. Chromate reduction via hydrogen peroxide *in vitro* has been shown to produce hydroxyl radicals via, what is now believed to be a Fenton-like reaction [43–47].

Cysteine radicals, ascorbate-derived carbon-centered alkyl and formyl radicals, and glutathione thiol radicals were demonstrated following the reaction of Cr(VI) with cysteine, ascorbate, and glutathione [48,49]. The above mentioned radicals may produce or contribute to the DNA oxidative damage [48,49].

Since ROS formation is involved in the renal damage by  $K_2Cr_2O_7$ , we investigated the expression and functional role of HO-1 in this model of ARF. To address the possible protective effect of HO-1 in this experimental model, this enzyme was induced by an injection of stannous chloride ( $SnCl_2$ ) [8,50] 12 h before  $K_2Cr_2O_7$  administration. HO activity was inhibited with an injection of zinc (II) protoporphyrin IX (ZnPP) 18 h before  $K_2Cr_2O_7$  administration [51] to probe that HO-1 was responsible for the  $SnCl_2$  effects in animals treated with both  $K_2Cr_2O_7$  and  $SnCl_2$ .

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Formaldehyde,  $K_2Cr_2O_7$ , and  $SnCl_2$  were from J. T. Baker (Mexico City, Mexico). Zinc (II) protoporphyrin IX was from Porphyrin Products Inc. (Logan, UT, USA); and, p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 3,3-diaminobenzidine (DAB), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), and hemin were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Commercial kits to measure creatinine and blood urea nitrogen were from Spinreact (Girona, Spain). Rabbit anti-HO-1 polyclonal antibodies (catalogue number SPA-895) used in the Western blot

and immunohistochemical analyses were from Stressgen Biotechnologies Co. (Victoria, British Columbia, Canada). Rabbit antinitrotyrosine polyclonal antibodies were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Antirabbit IgG horseradish peroxidase antibody and enhanced chemiluminescence (ECL) kit for Western blot were purchased from Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, England). All other chemicals were reagent grade and commercially available.

### Experimental design

Male Wistar rats with an initial body weight of 290–310 g were used. Seven groups of rats were studied ( $n = 5–15$ /group): (i) CT, control injected subcutaneously with 1.0 ml isotonic saline solution; (ii)  $K_2Cr_2O_7$ , treated with potassium dichromate; (iii)  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$ , treated with potassium dichromate and stannous chloride; (iv)  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2 + ZnPP$ , treated with potassium dichromate, stannous chloride, and zinc (II) protoporphyrin IX; (v)  $SnCl_2 + ZnPP$ , treated with stannous chloride and zinc (II) protoporphyrin IX; (vi)  $SnCl_2$ , treated with stannous chloride; and, (vii) ZnPP, treated with zinc (II) protoporphyrin IX.

Potassium dichromate was administered by a single subcutaneous injection at a dose of 15 mg/kg [34,35]. Stannous chloride was administered by a single subcutaneous injection at a dose of 100 mg/kg 12 h before  $K_2Cr_2O_7$  (groups 3 and 4) or vehicle (groups 5 and 6) [8]. Zinc (II) protoporphyrin IX was administered by a single subcutaneous injection at a dose of 45  $\mu$ mol/kg 18 h before  $K_2Cr_2O_7$  (group 4) or vehicle (groups 5 and 7) [51]. The groups of rats that did not receive  $K_2Cr_2O_7$ ,  $SnCl_2$ , or ZnPP were injected with vehicle at the corresponding times. Rats had free access to water and food and were maintained in metabolic cages to collect 24 h urine to measure the markers of renal tubular function: (i) excretion of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), and (ii) total protein.

Animals were sacrificed 24 h after  $K_2Cr_2O_7$  or vehicle injection by decapitation and blood was collected at room temperature to obtain serum which was stored at  $-40^\circ C$  until the markers of glomerular function, serum creatinine, and blood urea nitrogen (BUN) were determined. Creatinine clearance was calculated with the standard formula. One kidney was quickly removed to obtain samples for histological studies and immunohistochemical localization of HO-1 and nitrotyrosine, a marker of endogenous production of peroxynitrite that is readily produced from superoxide anion ( $O_2^-$ ) and nitric oxide (NO). This marker of oxidative stress (nitrotyrosine content) is increased in human umbilical vein endothelial cells incubated with  $K_2Cr_2O_7$  [52]. Additionally, it has been documented that  $K_2Cr_2O_7$  induces  $O_2^-$  generation

[38,39,53]. The other kidney was removed and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until the protein carbonyl content, a relatively stable marker of protein oxidation by ROS, was measured and microsomal fraction was prepared.

#### Analytical methods

BUN and creatinine were measured using commercial kits, according to the manufacturers' instructions, and were expressed as mg/dl. Total protein in urine was measured by a turbidimetric method with 12.5% trichloroacetic acid at 420 nm [54] and data were expressed as mg/24 h. Urinary NAG activity was determined at 405 nm using p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide as substrate and data were expressed as U/24 h [55]. One unit of NAG was defined as the amount of enzyme that releases 1  $\mu\text{mol}$  of p-nitrophenol in the assay conditions.

#### Heme oxygenase enzyme activity

Renal microsomal membrane fractions were prepared, as described previously [8], to measure HO activity by bilirubin generation. Microsomes (75 and 150  $\mu\text{g}$ ) were incubated with mouse liver cytosol, a source of bilirubin reductase (25  $\mu\text{l}$ ), hemin (100  $\mu\text{M}$ ), glucose-6-phosphate (5 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (4 U/ml), and NADPH (0.8 mM) for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in the dark. The formed bilirubin was extracted with chloroform and  $\Delta\text{OD}$  464 to 530 nm was measured (bilirubin extinction coefficient is  $40\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); enzyme activity was expressed as nmol of bilirubin formed/mg of protein/h [8,17].

#### Heme oxygenase-1 Western blot

Kidney microsomal proteins (100  $\mu\text{g}$ ) were electrophoresed on a denaturing 12% polyacrylamide gel. Protein samples were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes and Western blot analysis was performed using a rabbit anti-HO-1 polyclonal antibody and a chemiluminescent detection system [55].

#### Histological studies

Kidney sections were fixed in 10% neutral-buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin [55]. Sections at 3  $\mu\text{m}$  of thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H&E). A quantitative histological damage was determined by using a Leica Qwin Image Analyzer (Cambridge, England). The histological profiles of thirty proximal tubules randomly selected per rat (5–15 rats per experimental group) were recorded. The percentage of tubules with histopathological alterations like swelling, cytoplasmic vacuolization, desquamation, or necrosis was obtained. The percentage of cells with histological damage per each tubule was quantified ( $n = 3\text{--}5$  cells/tubule). The cellular size of damaged

tubular cells was measured to evaluate the swelling in these cells. Data were expressed as the percentage of control cells (100%). Total surface area of tubular cells in square microns was determined, the surface area occupied by vacuoles was measured, and the percentage of this affected area was then calculated.

#### Immunohistochemical localization of HO-1 and nitrotyrosine

Kidney sections of 3  $\mu\text{m}$  thickness were obtained, deparaffined with xylol, and rehydrated with ethanol. Endogenous peroxidase was quenched/inhibited with 4.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanol for 1.5 h at room temperature. Nonspecific adsorption was minimized by leaving the sections in 3% bovine albumin in PBS for 30 min. Sections were incubated overnight with a 1:700 dilution of antinitrotyrosine antibody or 1:500 dilution of primary rabbit anti-HO-1 polyclonal antibody. Samples were incubated with a 1:500 dilution of a peroxidase-conjugated antirabbit IgG antibody for 1 h and, finally, incubated with  $\text{H}_2\text{O}_2$ -DAB for 1 min. Sections were counterstained with hematoxylin and observed under light microscopy. Quantitative image analysis was performed with a Zeiss KS 300 Imaging System 3.0 (Zeiss, Göttingen, Germany).

#### Protein carbonyl content

Protein carbonyl groups were detected by their reactivity with DNPH to form protein hydrazones [56]. The protein hydrazones were detected at 370 nm.

#### Statistics

Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by ANOVA and Bonferroni *t*-test using the software Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA). A *p* value less than .05 was considered statistically significant.

## RESULTS

#### HO-1 content and HO activity in kidney

HO-1 was induced by administrating  $\text{SnCl}_2$  (100 mg/kg) 12 h before  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  treatment. HO-1 content (Fig. 1A) and HO activity (Fig. 1B) were increased by  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  alone. HO-1 content and HO activity were increased by  $\text{SnCl}_2$  ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{SnCl}_2$  and  $\text{SnCl}_2$  groups). HO-1 content was significantly higher in the  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{SnCl}_2$  group (27-fold) than in the  $\text{SnCl}_2$  group (13-fold) or  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  group (2.6-fold). HO-1 content was increased by  $\text{SnCl}_2$  in the  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{SnCl}_2 + \text{ZnPP}$  (28-fold) and  $\text{SnCl}_2 + \text{ZnPP}$  (27-fold) groups (Fig. 1A), and the HO activity was inhibited by ZnPP in both groups (Fig. 1B). The HO-1 content was higher in the

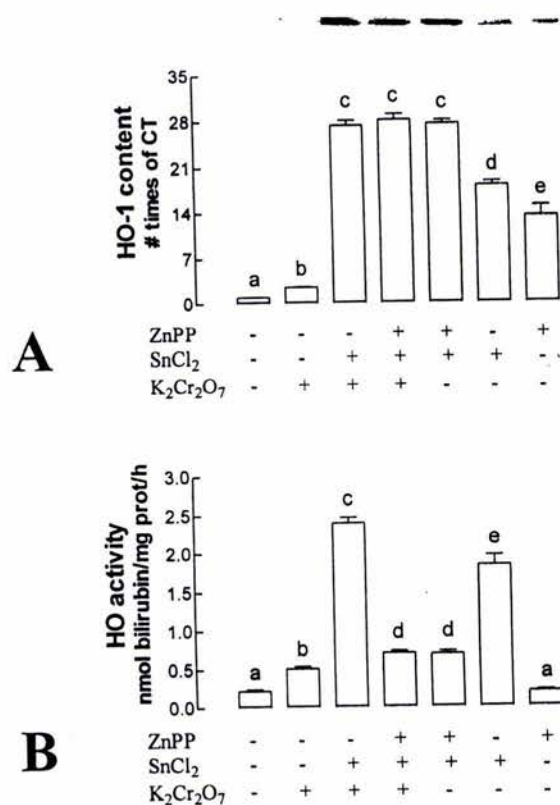


Fig. 1. (A) Western blot of HO-1: representative image (upper panel) and densitometric quantitative analysis (lower panel); and (B) HO activity in kidney 24 h after  $K_2Cr_2O_7$  or vehicle injection in the seven groups studied. Mean  $\pm$  SEM; groups with a different letter are significantly different ( $p < .05$ );  $n = 5-15$ .

ZnPP group (18-fold) than in the CT group, but the HO activity was similar in both groups.

#### Urinary excretion of NAG and total protein

Urinary excretion of total protein (Fig. 2A) and NAG (Fig. 2B) increased in the  $K_2Cr_2O_7$  group (17-fold and 9-fold, respectively). The increase in both parameters was partially prevented by  $SnCl_2$  treatment ( $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  group). The protective effect of  $SnCl_2$  was partially lost by ZnPP pretreatment ( $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  + ZnPP group). Urinary excretion of NAG and total protein were similar in the CT,  $SnCl_2$  + ZnPP,  $SnCl_2$ , and ZnPP groups.

#### BUN and creatinine clearance

BUN (Fig. 3A) increased 1.8-fold and creatinine clearance (Fig. 3B) decreased 55% in the  $K_2Cr_2O_7$  group. These changes were completely prevented by  $SnCl_2$  pretreatment ( $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  group). The protective effect of  $SnCl_2$  was lost by ZnPP pretreatment ( $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  + ZnPP group). BUN and creatinine

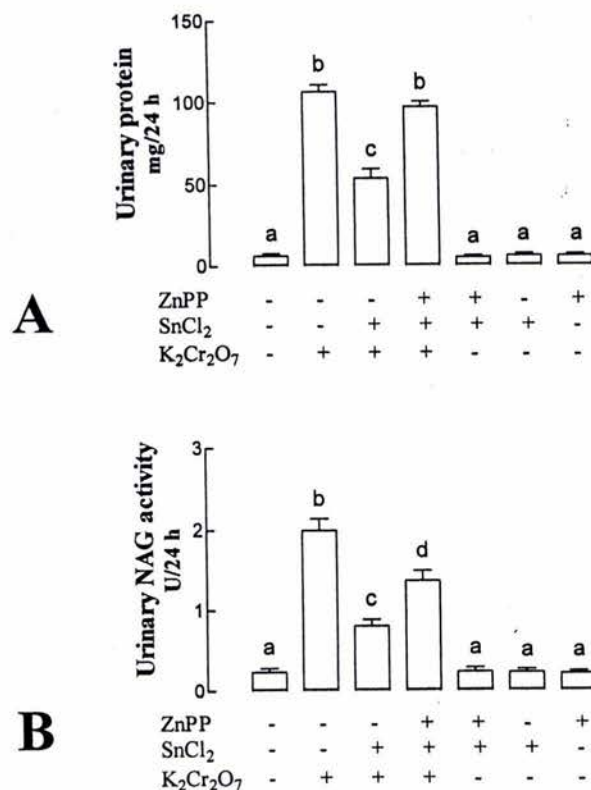


Fig. 2. Urinary excretion of (A) total protein and (B) NAG 24 h after  $K_2Cr_2O_7$  or vehicle injection in the seven groups studied. Mean  $\pm$  SEM; groups with a different letter are significantly different ( $p < .05$ );  $n = 5-15$ .

clearance were similar in the CT,  $SnCl_2$  + ZnPP,  $SnCl_2$ , and ZnPP groups.

#### Histopathological analysis

Histological analysis showed necrosis (swelling and vacuolization) in proximal tubular epithelial cells in the  $K_2Cr_2O_7$  group (Fig. 4, upper panel). Tubules with histological damage, cells with histological damage/tubule, cellular size, and vacuoles area/cell were quantified (Table 1). Preinduction of HO-1 with  $SnCl_2$  significantly decreased the histological damage ( $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  group). The protective effect of  $SnCl_2$  on these histological markers was completely lost by ZnPP pretreatment ( $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  + ZnPP group). There were no renal histological alterations in the  $SnCl_2$ ,  $SnCl_2$  + ZnPP, and ZnPP groups (Table 1 and data not shown).

#### Immunohistochemistry of HO-1

HO-1 immunostaining was found in some tubular cells in low quantity in the  $K_2Cr_2O_7$  group and HO-1 was markedly induced in proximal tubular cells in the  $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  and  $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  + ZnPP groups (Fig. 4, middle panel), and in the  $SnCl_2$  + ZnPP and



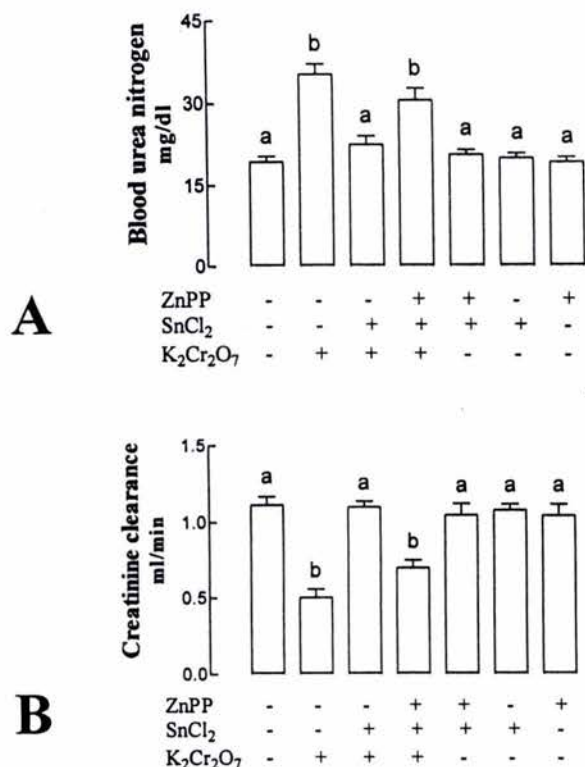


Fig. 3. (A) BUN and (B) creatinine clearance 24 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection in the seven groups studied. Mean  $\pm$  SEM; groups with a different letter are significantly different ( $p < .05$ );  $n = 5-15$ .

SnCl<sub>2</sub> groups (data not shown). In agreement with Western blot data, the HO-1 immunostaining in the ZnPP group was lower than that in the SnCl<sub>2</sub> + ZnPP and SnCl<sub>2</sub> groups (data not shown). No immunostaining for HO-1 was observed in the CT group, and HO-1 immunostaining was absent in glomeruli in all cases.

#### Oxidative stress markers

Nitrotyrosine immunohistochemistry was markedly increased (3.5-fold) in proximal tubules from K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-treated rats (Table 2 and Fig. 4, lower panel). This effect was partially prevented by SnCl<sub>2</sub> pretreatment (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub> group). The protective effect of SnCl<sub>2</sub> was completely lost by ZnPP pretreatment (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub> + ZnPP group). Immunostaining for nitrotyrosine in the SnCl<sub>2</sub> + ZnPP, SnCl<sub>2</sub> (Table 2), and ZnPP groups was similar to that of the CT group (data not shown). Only proximal tubules were positive for nitrotyrosine immunostaining. Protein carbonyl content increased 1.36-fold in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-treated rats (Fig. 5). This effect was completely prevented by SnCl<sub>2</sub> pretreatment (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub> group). The protective effect of SnCl<sub>2</sub> was completely lost by ZnPP pretreatment (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub> + ZnPP group). Protein carbonyl

content in the SnCl<sub>2</sub> + ZnPP, SnCl<sub>2</sub>, and ZnPP groups was similar to that of the CT group (Fig. 5).

#### DISCUSSION

Occupational exposure to chromium has been associated with ARF [30,31,34,35] and experimental data shows that chromate selectively affects the convoluted section of the proximal tubules [34,35,57,58]. Clinical and experimental renal damage induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> has been associated with oxidative stress [36-41]. This may explain why some antioxidants, such as ascorbic acid, vitamin E, N-acetyl cysteine, and glutathione, prevent [53,59-62]—and the inhibition of glutathione biosynthesis enhances [53,60]—the K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced renal damage.

In our study, the renal oxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> was shown clearly by the increase in protein carbonyl and nitrotyrosine contents. Nitrotyrosine immunostaining was seen only in proximal tubules, the site where K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> exerts its nephrotoxic action. Nitrotyrosine is thought to be a relatively specific marker of oxidative damage mediated by peroxynitrite, which is produced by the reaction between O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO [63]. The increase in nitrotyrosine production may be secondary to the increase of either NO or O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and it has been documented that K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> enhances O<sub>2</sub><sup>-</sup> production [38,39,52,53]. Pritchard *et al.* [52] found that K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> decreases NO production and increases superoxide anion and nitrotyrosine production in human umbilical vein endothelial cells. Presently, we do not know if renal NO production is enhanced in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-treated rats. The data of the literature are not consistent and are not strictly comparative: (i) K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> decreases NO production in human umbilical vein endothelial cells [52], (ii) CrCl<sub>3</sub> has no effect on NO production in murine macrophages [64], and (iii) NO production is enhanced by peritoneal exudates cells (mainly macrophages) obtained from sodium dichromate-treated rats [65]. Our data of protein carbonyl content suggest that the renal oxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> is more general and not only dependent on peroxynitrite.

Taking into account that oxidative stress enhances HO-1 expression [1,12-14], in this work we questioned if this enzyme is induced in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> nephrotoxicity. It was found that HO-1 was induced in kidney by a single injection of K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; however, HO-1 induction was very small compared to the effect of other metals such as nickel, lead, mercury, and tin [8,10]. To address the possible protective effect of HO-1 in this experimental model, this enzyme was induced by an injection of SnCl<sub>2</sub> 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> administration. The enzyme was induced in proximal tubules, the same site where K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> exerts its nephrotoxic action and induces oxi-

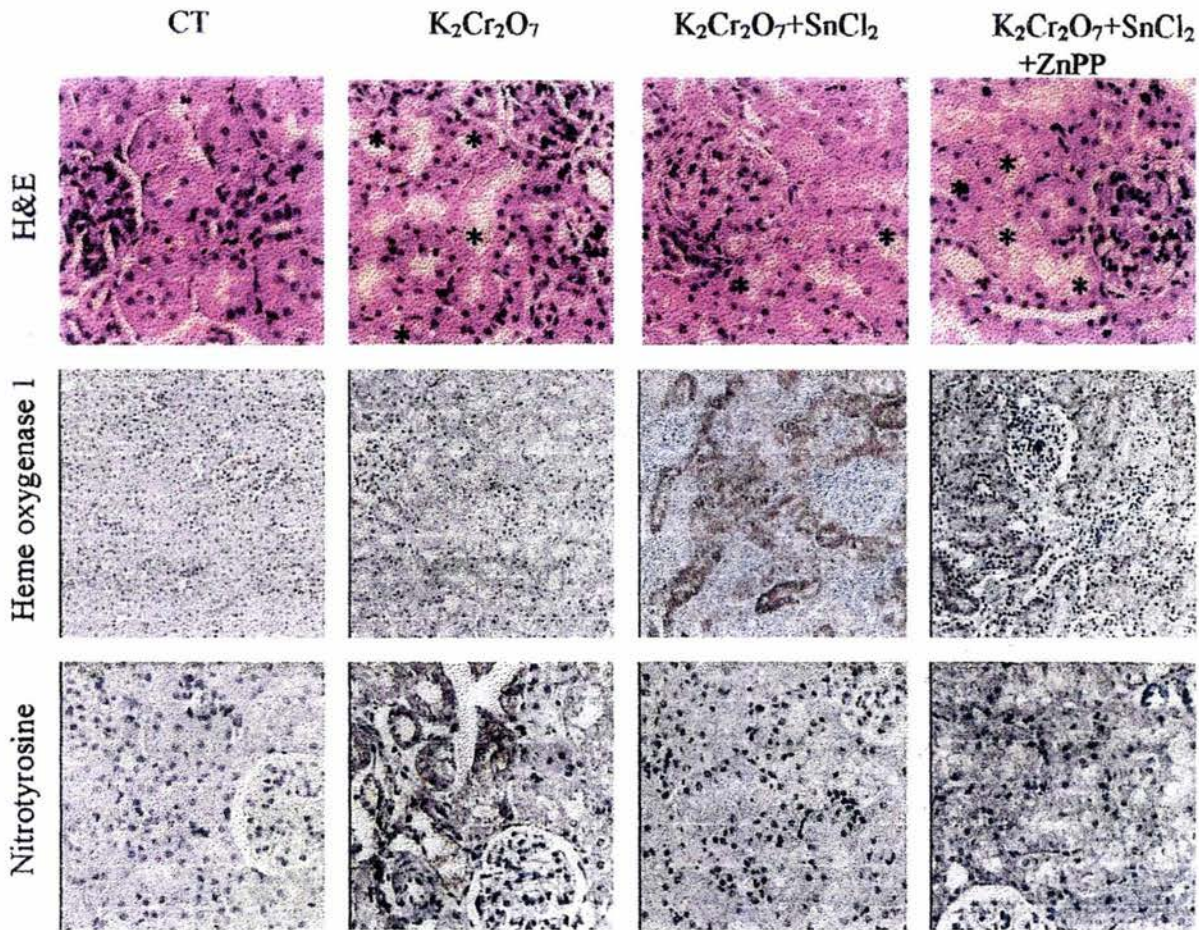


Fig. 4. Upper panel: light microscopy (H&E, 400 $\times$ ), asterisk indicates tubules with damage; middle panel: immunohistochemistry for HO-1 (peroxidase-DAB with hematoxylin counterstain, 100 $\times$ ); lower panel: immunohistochemistry for nitrotyrosine (400 $\times$ ) in renal sections of rats.

ductive stress.  $SnCl_2$  pretreatment was associated with the attenuation of both ARF and the increase in protein carbonyl content and nitrotyrosine immunostaining. Damage to the tubular function was partially prevented and this was strongly associated with the attenuation of the structural damage. In addition, the glomerular function was completely recovered by  $SnCl_2$  pretreatment.

Other authors also have found that the preinduction of HO-1 with  $SnCl_2$  has a protective effect on HO-1 in renal ischemia/reperfusion [50], cardiac hypertrophy in genetically hypertensive rats [66], and corneal inflammation [67].

We found that the HO-1 content in the  $K_2Cr_2O_7$  +  $SnCl_2$  group was significantly higher than the increase in

Table 1. Quantitative Analysis of Tubular Histological Damage

Group	Tubules with histological damage (%)	Cells with histological damage/tubule (%)	Cellular size (% area)	Vacuoles area (% of cell area)
CT	ND	ND	100 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	ND
$K_2Cr_2O_7$	60 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	51 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	241 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
$K_2Cr_2O_7$ + $SnCl_2$	31 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	161 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	13 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
$K_2Cr_2O_7$ + $SnCl_2$ + ZnPP	54 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	49 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	232 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
$SnCl_2$	ND	ND	100 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	ND

Mean  $\pm$  SEM;  $n$  = 5–15 rats; groups with a different letter are significantly different ( $p$  < .001). ND = not detected.

Table 2. Quantitative Analysis of Nitrotyrosine Immunohistochemistry

Group	Nitrotyrosine (# times of CT)
CT	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	3.54 ± 0.05 <sup>b</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> + SnCl <sub>2</sub>	1.38 ± 0.02 <sup>c</sup>
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> + SnCl <sub>2</sub> + ZnPP	3.48 ± 0.05 <sup>b</sup>
SnCl <sub>2</sub>	1.00 ± 0.01 <sup>a</sup>

Mean ± SEM; n = 5–10 rats; groups with a different letter are significantly different (*p* < .001).

the K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or SnCl<sub>2</sub> group. The synergism of two substances on HO-1 induction also has been observed by others. Cable *et al.* [68] observed in chick embryo liver cells a synergistic induction of HO-1 by iron and glutathimide. They found that this synergism was heme dependent. Additionally, Sunderman [69] found that the synergism of nickel and diethyldithiocarbamate on HO activity may be attributable, at least in part, to the enhanced cellular uptake of nickel. Additional experiments should be done to establish the mechanism by which SnCl<sub>2</sub> and K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> exert a synergistic effect on HO-1.

The mechanism by which HO-1 overexpression ameliorates ARF may be related to the decrease in oxidative stress, which was almost completely prevented by SnCl<sub>2</sub> pretreatment. The experiments with ZnPP suggest the role of HO-1 in the protective effect of SnCl<sub>2</sub>. ZnPP not only inhibited HO activity but also reverted the protective effect of SnCl<sub>2</sub> on ARF and on oxidative stress. ZnPP also induced HO-1 levels, which was not a surprise because it has been found that ZnPP is a potent inducer of HO-1 gene expression; however, the enzyme is competitively inhibited [70]. We are tempted to speculate that (i) bilirubin, a powerful antioxidant produced by the

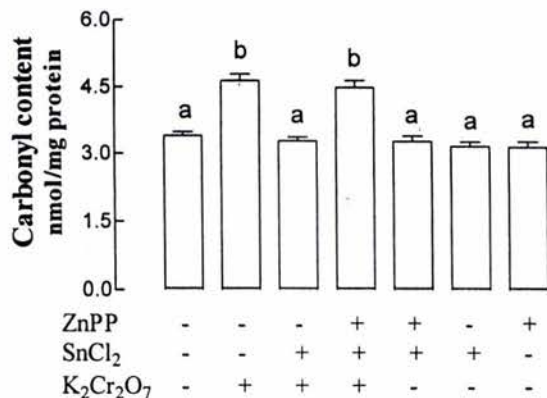


Fig. 5. Protein carbonyl content in kidney 24 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection in the seven groups of rats studied. Mean ± SEM; groups with a different letter are significantly different (*p* < .05); n = 5–6.

consecutive action of HO-1 and biliverdin reductase [1,2,71], could be involved in the reduction of oxidative stress in our experimental model; and, (ii) carbon monoxide, another product of HO-1 reaction and a potent vasodilator [1,3,24], could contribute to reestablish the creatinine clearance, a marker of glomerular filtration rate.

In conclusion, our data show that renal HO-1 overexpression induced by SnCl<sub>2</sub> is responsible for the attenuation of renal damage and oxidative stress in rats with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced ARF. This is a novel way to protect against K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced renal injury. Our findings are relevant to K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> nephrotoxicity, however more experiments should be done to study if HO-1 preinduction may ameliorate K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> toxicity to other organs such as liver.

**Acknowledgements**—This work was supported by CONACYT (#25441 and G36923-M), DGAPA (IN210201), and PAEP (203307). D. B. received a scholarship from CONACYT (#129718) and DGAPA (#5991701).

#### REFERENCES

- [1] Dennery, P. A. Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr. Top. Cell. Regul.* **36**:181–199; 2000.
- [2] Dennery, P. A.; Weng, Y. H.; Stevenson, D. K.; Yang, G. J. The biology of bilirubin production. *J. Perinatol.* **21**(Suppl. 1):S17–S20; 2001.
- [3] Choi, A. M. K.; Alam, J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **15**:9–19; 1996.
- [4] Maines, M. D.; Panahian, N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv. Exp. Med. Biol.* **502**:249–272; 2001.
- [5] Scapagnini, G.; D'Agata, V.; Calabrese, V.; Pascale, A.; Colombrita, C.; Alkon, D.; Cavallaro, S. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res.* **954**:51–59; 2002.
- [6] McCoubrey, W. K. Jr.; Ewing, J. F.; Maines, M. D. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**:13–20; 1992.
- [7] Shibahara, S.; Yoshizawa, M.; Suzuki, H.; Takeda, K.; Meguro, K.; Endo, K. Functional analysis of cDNAs for two types of human heme oxygenase and evidence for their separate regulation. *J. Biochem.* **113**:214–218; 1993.
- [8] Da Silva, J. L.; Zand, B. A.; Yang, L. M.; Sabaawy, H. E.; Lianos, E.; Abraham, N. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the kidney. *Kidney Int.* **59**:1448–1457; 2001.
- [9] Pedraza-Chaverri, J.; Croatt, A. J.; Haggard, J. J.; Khositseth, S.; Nath, K. A. Heme oxygenase 1 (HO-1) is induced in a rat model of hemolytic uremic syndrome and protects against renal dysfunction and mortality. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**:789A–790A; 2001.
- [10] Abraham, N. G.; Lin, J. H.; Schwartzman, M. L.; Levere, R. D.; Shibahara, S. The physiological significance of heme oxygenase. *Int. J. Biochem.* **20**:543–558; 1988.
- [11] Keyse, S.; Tyrrell, R. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:99–103; 1989.
- [12] Stocker, R. Induction of haem oxygenase as a defense against oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* **9**:101–112; 1990.

- [13] Applegate, L. A.; Luscher, P.; Tyrrel, R. M. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* **51**:974-978; 1991.
- [14] Nath, K. A. The functional significance of the induction of heme oxygenase by oxidative stress. *J. Lab. Clin. Med.* **123**:461-463; 1994.
- [15] Nath, K. A.; Balla, G.; Vercellotti, G. M.; Balla, J.; Jacob, H. S.; Levitt, M. D.; Rosenberg, M. E. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J. Clin. Invest.* **90**:267-270; 1992.
- [16] Yoneya, R.; Ozasa, H.; Nagashima, Y.; Teraoka, H.; Hagaiwara, K.; Horikawa, S. Hemin pretreatment ameliorates aspects of the nephropathy induced by mercuric chloride in the rat. *Toxicol. Lett.* **116**:223-229; 2000.
- [17] Agarwal, A.; Balla, J.; Alam, J.; Croatt, A. J.; Nath, K. A. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int.* **48**:1298-1307; 1995.
- [18] Yang, L.; Quan, S.; Abraham, N. G. Retrovirus-mediated HO gene transfer into endothelial cells protects against oxidant-induced injury. *Am. J. Physiol.* **277**:L127-L133; 1999.
- [19] Kushida, T.; Volti, G. L.; Quan, S.; Goodman, A.; Abraham, N. G. Role of human heme oxygenase-1 in attenuating TNF- $\alpha$ -mediated inflammation injury in endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* **87**:377-385; 2002.
- [20] Nath, K. A.; Haggard, J. J.; Croatt, A. J.; Grande, J. P.; Poss, K. D.; Alam, J. The indispensability of heme oxygenase-1 (HO-1) in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am. J. Pathol.* **156**:1527-1535; 2000.
- [21] Yet, S. F.; Perrella, M. A.; Layne, M. D.; Hsieh, C. M.; Maemura, K.; Kobzik, L.; Wiesel, P.; Christou, H.; Kourembanas, S.; Lee, M. E. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J. Clin. Invest.* **103**:R23-R29; 1999.
- [22] Poss, K. D.; Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase-1 deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10925-10930; 1997.
- [23] Shiraishi, F.; Curtis, L. M.; Truong, L.; Poss, K.; Visner, G. A.; Madsen, K.; Nick, H. S.; Agarwal, A. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am. J. Physiol.* **278**:F726-F736; 2000.
- [24] Suttner, D. M.; Dennery, P. A. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* **13**:1800-1809; 1999.
- [25] Kanakiriya, S.; Nath, K. Heme oxygenase and acute renal injury. In: Molitoris, B.; Finn, W., eds. *Acute renal failure. A companion to Brenner and Rector's "the kidney"*. Darien, IL: W. B. Saunders Co.; 2001:78-88.
- [26] Barceloux, D. G. Chromium. *Clin. Toxicol.* **37**:173-194; 1999.
- [27] Verschoor, M. A.; Braget, P. C.; Herber, R. F. M.; Zielhuis, R. L.; Zwennis, W. C. Renal function of chrome-plating workers and welders. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **60**:67-70; 1988.
- [28] Ingber, A.; Gammelgaard, B.; David, M. Detergents and bleaches are sources of chromium contact dermatitis in Israel. *Contact Dermatitis* **38**:101-104; 1998.
- [29] Norseth, T. The carcinogenicity of chromium and its salts. *Br. J. Ind. Med.* **43**:1114-1116; 1986.
- [30] Sharma, B. K.; Singhal, P. C.; Chugh, K. S. Intravascular haemolysis and renal failure following potassium dichromate poisoning. *Postgrad. Med. J.* **54**:414-415; 1978.
- [31] Picaud, J. C.; Cochat, P.; Parchoux, B.; Berthier, J. C.; Gilly, J.; Chareyre, S.; Larbre, F. Acute renal failure in a child after chewing of match heads. *Nephron* **57**:225-226; 1991.
- [32] Michael, U. F.; Logan, J. L.; Meeks, L. A. The beneficial effects of thyroxine on nephrotoxic acute renal failure in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1**:1236-1240; 1991.
- [33] Seiken, G.; Grillo, F. G.; Schaudies, R. P.; Johnson, J. P. Modulation of renal EGF in dichromate-induced acute renal failure treated with thyroid hormone. *Kidney Int.* **45**:1622-1627; 1994.
- [34] Pedraza-Chaverri, J.; Moreno-Muñiz, S. I.; Cruz, C.; Hernández-Pando, R.; Larriva-Sahd, J.; Tapia, E. Urinary angiotensin I-converting enzyme activity is increased in experimental acute renal failure. *Clin. Invest. Med.* **18**:424-434; 1995.
- [35] Franchini, I.; Mutti, A.; Cavatorta, A.; Corradi, A.; Cosi, A.; Olivette, G.; Borghetti, A. Nephrotoxicity of chromium. *Contrib. Nephrol.* **10**:98-110; 1978.
- [36] Huang, Y. L.; Chen, C. Y.; Sheu, J. Y.; Chuang, I. C.; Pan, J. H.; Lin, T. H. Lipid peroxidation in workers exposed to hexavalent chromium. *J. Toxicol. Environ. Health A* **56**:235-247; 1999.
- [37] Sengupta, T.; Chattopadhyay, D.; Ghosh, N.; Maulik, G.; Chatterjee, G. C. Impact of chromium on lipoperoxidative processes and subsequent operation of the glutathione cycle in rat renal system. *Indian J. Biochem. Biophys.* **29**:287-290; 1992.
- [38] Liu, K.; Shi, X. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol. Cell. Biochem.* **222**:41-47; 2001.
- [39] Stohs, S. J.; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**:321-336; 1995.
- [40] Bagchi, D.; Stohs, S.; Downs, B.; Bagchi, M.; Preuss, H. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* **180**:5-22; 2002.
- [41] Stohs, S. J.; Bagchi, D.; Hassoun, E.; Bagchi, M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**:201-213; 2000.
- [42] Shi, X.; Dalal, N. S. Generation of hydroxyl radical by dichromate in biologically relevant systems: role of Cr(VI) complex versus tetraperchromate(V). *Environ. Health Perspect.* **102**:231-236; 1994.
- [43] O'Brien, P.; Kortenkamp, A. Chemical models important in understanding the ways in which chromate can damage DNA. *Environ. Health Perspect.* **102**(Suppl. 3):3-10; 1994.
- [44] Aiyar, J.; Berkovits, H. J.; Floyd, R. A.; Wetterhahn, K. E. Reaction of chromium (VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environ. Health Perspect.* **92**:53-62; 1991.
- [45] Shi, X. L.; Dalal, N. S. Evidence for a Fenton-like type mechanism for the generation of  $\cdot$ OH radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**:90-95; 1990.
- [46] Liu, K. L.; Shi, X.; Dalal, N. S. Synthesis of Cr(VI)-GSH, its identification, and its free hydroxyl radical generation: a model compound for Cr(VI) carcinogenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**:54-58; 1997.
- [47] Tsou, T. C.; Chen, C. L.; Liu, T. Y.; Yang, J. L. Induction of 8-hydroxycycloxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* **17**:103-108; 1996.
- [48] Faux, S. P.; Gao, M.; Chipman, J. K.; Levy, L. S. Production of 8-hydroxycycloxyguanosine in isolated DNA by chromium(VI) and chromium(V). *Carcinogenesis* **13**:1667-1669; 1992.
- [49] Shi, X.; Mao, Y.; Knapton, A. D. Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydroxyl radicals and cause DNA damage: role of a Cr(IV)-mediated Fenton-like reaction. *Carcinogenesis* **15**:2475-2478; 1994.
- [50] Toda, N.; Takahashi, T.; Mizobuchi, Z.; Fujii, H.; Nakahira, K.; Takahashi, S.; Yamashita, M.; Morita, K.; Hirakawa, M. Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit. Care Med.* **30**:1512-1522; 2002.
- [51] Vacharajani, T. J.; Work, J.; Issekutz, A. C.; Granger, D. N. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am. J. Physiol.* **278**:H1613-H1617; 2000.
- [52] Pritchard, K. A. Jr.; Ackerman, A.; Kalyanaraman, B. J. Chromium (VI) increases endothelial cell expression of ICAM-1 and decreases nitric oxide activity. *Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**:251-260; 2000.
- [53] Sugiyama, M. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.* **12**:397-407; 1992.
- [54] Pedraza-Chaverri, J.; Granados-Silvestre, M. D.; Medina-Campos, O. N.; Hernández-Pando, R. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:245-253; 1999.
- [55] Pedraza-Chaverri, J.; Maldonado, P. D.; Medina-Campos, O. N.;

- Olivares-Corichi, I. M.; Granados-Silvestre, M. A.; Hernández-Pando, R.; Ibarra-Rubio, M. E. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:602–611; 2000.
- [56] Reznick, A. Z.; Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**:357–363; 1994.
- [57] Berry, J. P.; Hourdry, J.; Galle, P.; Lagrue, G. Chromium concentration by proximal renal tubule cells: an ultrastructural, microanalytical, and cytochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* **26**:651–657; 1978.
- [58] Evan, A. P.; Dail, W. G. The effects of sodium chromate on the proximal tubules of the rat kidney. *Lab. Invest.* **30**:704–714; 1974.
- [59] Na, K. J.; Jeong, S. Y.; Lim, C. H. The role of glutathione in the acute nephrotoxicity of sodium dichromate. *Arch. Toxicol.* **66**:646–651; 1992.
- [60] Standeven, A. M.; Wetterhahn, K. E. Possible role of glutathione in chromium(VI) metabolism and toxicity in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **69**:469–476; 1991.
- [61] Appenroth, D.; Winnefeld, K. Vitamin E and C in the prevention of metal nephrotoxicity in developing rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* **50**:391–396; 1998.
- [62] Hojo, Y.; Satomi, Y. In vivo nephrotoxicity induced in mice by chromium(VI). Involvement of glutathione and chromium(V). *Biol. Trace Elem. Res.* **31**:21–31; 1991.
- [63] Oldreive, C.; Rice-Evans, C. The mechanisms for nitration and nitrotyrosine formation in vitro and in vivo: impact of diet. *Free Radic. Res.* **35**:215–231; 2001.
- [64] Tian, L.; Lawrence, D. A. Metal-induced modulation of nitric oxide production in vitro by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**:540–547; 1996.
- [65] Bagchi, D.; Hassoun, E. A.; Bagchi, M.; Stohs, S. J. Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in Sprague-Dawley rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **110**:177–187; 1995.
- [66] Seki, T.; Naruse, M.; Naruse, K.; Yoshimoto, T. Induction of heme oxygenase produces load-independent cardioprotective effects in hypertensive rats. *Life Sci.* **65**:1077–1086; 1999.
- [67] Laniado-Schwartzman, M.; Abraham, N. G.; Connors, M.; Dunn, M. W.; Levere, R. D.; Kappas, A. Heme oxygenase induction with attenuation of experimentally induced corneal inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **53**:1069–1075; 1997.
- [68] Cable, E.; Greene, Y.; Healey, J.; Evans, C. O.; Bonkovsky, H. Mechanism of synergistic induction of hepatic heme oxygenase by glutethimide and iron: studies in cultured chick embryo liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**:176–181; 1990.
- [69] Sunderman, F. W. Jr. Metal induction of heme oxygenase. *Ann. NY Acad. Sci.* **514**:65–80; 1987.
- [70] Yang, G.; Nguyen, X.; Ou, J.; Rekulapelli, P.; Stevenson, D. K.; Dennery, P. A. Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood* **97**:1306–1313; 2001.
- [71] Clark, J. E.; Foresti, R.; Green, C. J.; Motterlini, R. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem. J.* **3**:615–619; 2000.

#### ABBREVIATIONS

- ARF—acute renal failure  
 BUN—blood urea nitrogen  
 CT—control  
 DAB—3,3-diaminobenzidine  
 ECL—enhanced chemiluminescence  
 H&E—hematoxylin-eosin  
 HO—heme oxygenase  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—hydrogen peroxide  
 IgG—immunoglobulin G  
 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>—potassium dichromate  
 NADPH—nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form  
 NAG—N-acetyl-β-D-glucosaminidase  
 PBS—phosphate-buffered saline  
 ROS—reactive oxygen species  
 SEM—standard error of the mean  
 SnCl<sub>2</sub>—stannous chloride  
 ZnPP—zinc (II) protoporphyrin IX



## Protective effect of SnCl<sub>2</sub> on K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced nephrotoxicity in rats: The indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzymes

Diana Barrera<sup>a</sup>, Perla D. Maldonado<sup>a</sup>, Omar N. Medina-Campos<sup>a</sup>,  
Rogelio Hernández-Pando<sup>b</sup>, María E. Ibarra-Rubio<sup>a</sup>, José Pedraza-Chaverri<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio B, Segundo Piso, Lab 209, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México

<sup>b</sup>Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", 14000 México, D.F., México

Received 24 February 2003; accepted 2 June 2003

### Abstract

We have shown that the ameliorative effect of stannous chloride (SnCl<sub>2</sub>) pretreatment on potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)-induced renal damage 24 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> injection was associated with the induction of heme oxygenase-1 (HO-1). In this work we evaluated: (a) if the protective effect of SnCl<sub>2</sub> (given 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) is associated with changes in the renal activity of HO-1, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and catalase (CAT) 24 and 48 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> injection, and (b) if HO-1 induction is indispensable before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> injection. It was found that the protective effect of SnCl<sub>2</sub> on renal function was observed both at 24 and 48 h reaching its maximum at 24 h when HO-1 expression was higher. Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, and GR activities remained unchanged whereas GPx and CAT activities decreased at 48 h in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-treated rats. The activity of Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, CAT, and GR was unchanged in the SnCl<sub>2</sub>-treated rats. To fulfill the objective (b) groups of rats treated with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and SnCl<sub>2</sub> (given at the same time or 12 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) were studied 24 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-injection. The simultaneous injections of SnCl<sub>2</sub> and K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> had no protective effect whereas the injection of SnCl<sub>2</sub> 12 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> exacerbated renal damage. In conclusion, the protective effect of SnCl<sub>2</sub> on K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced nephrotoxicity is associated with HO-1 induction and not with other antioxidant enzymes (Cu,Zn-SOD, Mn-

\* Corresponding author. Tel./fax: +52-55-5622-3515.

E-mail address: [pedraza@servidor.unam.mx](mailto:pedraza@servidor.unam.mx) (J. Pedraza-Chaverri).

SOD, GPx, GR, and CAT) and SnCl<sub>2</sub> has a preventive and not a therapeutic effect on renal damage induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Potassium dichromate; Stannous chloride; Tin chloride; Acute renal failure; Oxidative stress; Nephrotoxicity; Heme oxygenase; Antioxidant enzymes; Protein carbonyl; Glutathione reductase; Glutathione peroxidase; Catalase; Superoxide dismutase

---

## Introduction

Reactive oxygen species (ROS) have been involved in the pathophysiology of experimental acute renal failure (ARF) (Nath and Norby, 2000; Pedraza-Chaverri et al., 1992, 2000; Rodrigo and Rivera, 2002; Ueda et al., 2001). ARF induced by potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) has been used as a model to study the pathophysiology of this disease (Pedraza-Chaverri et al., 1995b; Seiken et al., 1994). Experimental data show that chromate affects selectively the convoluted section of the proximal tubules (Berry et al., 1978; Evan and Dail, 1974; Franchini et al., 1978; Pedraza-Chaverri et al., 1995b) and induces acute necrosis of renal tubules (Franchini et al., 1978). Clinical and experimental renal damage induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> has been associated with oxidative stress (Bagchi et al., 2002; Huang et al., 1999; Liu and Shi, 2001; Sengupta et al., 1992; Stohs and Bagchi, 1995; Stohs et al., 2000). In fact, some antioxidants such as ascorbic acid, vitamin E, N-acetyl cysteine, and glutathione prevent the K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> induced renal damage (Appenroth and Winnefeld, 1998; Hojo and Satomi, 1991; Na et al., 1992; Standeven and Wetterhahn, 1991; Sugiyama, 1992) whereas the inhibition of glutathione biosynthesis enhances it (Standeven and Wetterhahn, 1991; Sugiyama, 1992). Evidences suggest that ROS are involved in Cr(VI)-induced cell injury (Bagchi et al., 2002; Liu and Shi, 2001; Sengupta et al., 1992; Stohs and Bagchi, 1995). Chromium reduction intermediates [Cr(V), Cr(IV), and Cr(III)], which may be generated during physiological conditions, may be toxic as they involve ROS production (O'Brien and Kortenkamp, 1994; Shi and Dalal, 1994; Stohs et al., 2000). In vitro chromate reduction via hydrogen peroxide has been shown to produce hydroxyl radicals via a Fenton-like reaction (Aiyar et al., 1991; Liu et al., 1997; O'Brien and Kortenkamp, 1994; Shi and Dalal, 1990; Tsou et al., 1996).

Modulation of antioxidant enzymes such as heme oxygenase 1 (HO-1), copper, zinc superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD), manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), catalase (CAT) or glutathione peroxidase (GPx) are able to modify the severity of ARF. The overexpression or the exogenous administration of HO-1, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, CAT or GPx is useful to ameliorate or prevent the damage induced by ROS in toxic or ischemic renal damage (Agarwal et al., 1995; Davis et al., 2001; Kanakiriya and Nath, 2001; Kawamura et al., 1991; Nakajima et al., 1994; Nath et al., 1992; Nishimura et al., 1995; Yin et al., 2001; Yoneya et al., 2000; Yoshioka et al., 1990; Zhong et al., 2001). Interestingly, HO-1 has not a protective role in all cases (Agarwal et al., 1995; Suttner and Dennery, 1999) and even the overexpression of this enzyme is toxic in some circumstances (Kanakiriya and Nath, 2001; Suttner and Dennery, 1999). In addition, it has been shown that the protective effect of some compounds is related to their capacity to increase the expression of antioxidant enzymes (de Cavanagh et al., 2000; Kawamura et al., 1991; Seth et al., 2000; Toda et al., 2002; Yoneya et al., 2000). In contrast, deficiency or inhibition of antioxidant enzymes aggravates the renal damage induced by ROS (Kanakiriya and Nath, 2001; Nath et

al., 2000; Nath and Paller, 1990; Shiraishi et al., 2000; Paller, 1991; Pedraza-Chaverri et al., 1995a, 1999).

We recently showed that stannous chloride ( $\text{SnCl}_2$ ) pretreatment has a protective role in  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -induced nephrotoxicity (Barrera et al., 2003).  $\text{SnCl}_2$  is a potent inducer of HO-1 (Da Silva et al., 2001; Laniado-Schwartzman et al., 1997; Seki et al., 1999; Toda et al., 2002) and the protective role of  $\text{SnCl}_2$  in this experimental model has been attributed, at least in part, to the HO-1 preinduction (Barrera et al., 2003). However it is unknown if, in addition to HO-1, the antioxidant enzymes Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, CAT, and glutathione reductase (GR), are associated with the protective effect of  $\text{SnCl}_2$  24 and 48 h after  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  injection and if HO-1 induction is indispensable before  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  administration. Therefore, this study was undertaken to address the above points.

## Methods

### Reagents

Formaldehyde,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , and  $\text{SnCl}_2$  were from J.T. Baker (México, D.F.). Xanthine, xanthine oxidase, diethyldithiocarbamic acid (DDC), nitroblue tetrazolium (NBT), p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), and hemin were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Commercial kits to measure creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were from Spinreact (Girona, Spain). Rabbit anti-HO-1 polyclonal antibodies (Catalogue number SPA-895), used in the western blot, were from Stressgen Biotechnologies Co. (Victoria, BC, Canada). Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase antibody and enhanced chemiluminescence (ECL) kit for Western blot were purchased from Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, England). All other chemicals were reagent grade and commercially available.

### Experimental design

Experimental protocols were approved by DGAPA (IN210201) and followed the guidelines of Norma Oficial Mexicana (NOM-ECOL-087-1995). Male Wistar rats with an initial body weight of 290–310 g were used in the present work. Four groups of rats were studied ( $n = 5/\text{group}$ ): (1) CT, control injected subcutaneously with vehicle (1.0 ml of isotonic saline solution); (2)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , treated with  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ; (3)  $\text{SnCl}_2$ , treated with  $\text{SnCl}_2$ ; and (4)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{SnCl}_2$ , treated with  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and  $\text{SnCl}_2$ .  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  was administered by a single subcutaneous injection at a dose of 15 mg/Kg (Franchini et al., 1978; Pedraza-Chaverri et al., 1995b).  $\text{SnCl}_2$  was administered by a single subcutaneous injection at a dose of 100 mg/Kg 12 h before  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (Barrera et al., 2003; Da Silva et al., 2001). The groups of rats that did not receive neither  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  nor  $\text{SnCl}_2$ , were injected with vehicle at the corresponding times. Animals had free access to water and food, and were maintained in metabolic cages to collect 24-h urine to measure the markers of renal tubular function: excretion of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) and total protein. Rats were sacrificed by decapitation at 24 or 48 h after  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  or vehicle injection. Blood was collected at room temperature to obtain serum which was stored at  $-40^\circ\text{C}$  until the markers of glomerular function (serum creatinine, creatinine clearance, and BUN) were determined. Creatinine clearance and BUN/creatinine ratio were calculated. One kidney was quickly removed to obtain samples for histological and morphometric studies and to measure the activity of Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx,



CAT, and GR. The other kidney was removed and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until protein carbonyl content, a relatively stable marker of ROS-induced protein oxidation, was measured.

In a further study designed to know if the previous induction of HO-1 is indispensable to observe the protective effect of  $\text{SnCl}_2$ , six groups of rats were studied ( $n=5/\text{group}$ ): (1) CT (control injected subcutaneously with 1.0 ml isotonic saline solution); (2)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (treated with  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ); (3)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{SnCl}_2-0$  ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and  $\text{SnCl}_2$  injected at the same time); (4)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{SnCl}_2-12$  ( $\text{SnCl}_2$  injected 12 h after  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ); (5)  $\text{SnCl}_2-0$  ( $\text{SnCl}_2$  and vehicle injected at the same time); and (6)  $\text{SnCl}_2-12$  ( $\text{SnCl}_2$  injected 12 h after vehicle).  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (15 mg/Kg) and  $\text{SnCl}_2$  (100 mg/Kg) were administered by a single subcutaneous injection. Rats were maintained in metabolic cages to collect 24-h urine and sacrificed 24 h after vehicle or  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  injection to evaluate renal function as described before. One kidney was quickly removed to obtain samples for histological studies and the other kidney was removed and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until protein carbonyl content was measured and microsomal fraction was obtained to perform HO-1 western blot.

#### *Analytical methods*

BUN and creatinine were measured using commercial kits according to the instructions of manufacturers and were expressed as mg/dl. Total protein in urine was measured by a turbidimetric method with 12.5% trichloroacetic acid at 420 nm (Pedraza-Chaverri et al., 1999) and data were expressed as mg/24 h. Urinary NAG activity was determined at 405 nm using p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide as substrate and data were expressed as U/24 h (Pedraza-Chaverri et al., 2000).

#### *HO activity*

Renal microsomal membrane fractions were prepared as previously described (Da Silva et al., 2001) to measure HO activity by bilirubin generation. Microsomes (75 and 150  $\mu\text{g}$ ) were incubated with mouse liver cytosol, a source of bilirubin reductase (25  $\mu\text{l}$ ), hemein (100  $\mu\text{M}$ ), glucose-6-phosphate (5 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (4 U/ml) and NADPH (0.8 mM) for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in the dark. The formed bilirubin was extracted with chloroform and  $\Delta\text{OD}$  464 to 530 nm was measured (bilirubin extinction coefficient is  $40\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) and enzyme activity was expressed as nmol of bilirubin formed/mg of protein/h (Agarwal et al., 1995; Barrera et al., 2003).

#### *HO-1 western blot*

Kidney microsomal proteins (100  $\mu\text{g}$ ) were electrophoresed on a denaturing 12% polyacrylamide gel and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Western blot analysis was performed using a rabbit anti HO-1 polyclonal antibody and a chemiluminescent detection system (Barrera et al., 2003; Pedraza-Chaverri et al., 2000).

#### *Histological studies*

Kidney sections were fixed in 10% neutral buffered formaldehyde solution, and embedded in paraffin (Pedraza-Chaverri et al., 2000). Sections at 4  $\mu\text{m}$  of thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H&E). A quantitative histological damage was determined by using a Leica Qwin

Image Analyzer (Cambridge, UK). The histological profile of thirty proximal tubules randomly selected per rat (5 rats per experimental group) was recorded. The percentage of tubules with histopathological alterations like swelling, cytoplasmic vacuolization, desquamation or necrosis was obtained. Data were expressed as percentage of damaged tubules.

#### Antioxidant enzymes

Kidney total SOD activity was assayed by a previously reported method using NBT as the indicator reagent at 560 nm. To measure Mn-SOD activity, Cu,Zn-SOD was inhibited with DDC (Pedraza-Chaverri et al., 2001). Cu,Zn-SOD activity was obtained by subtracting the activity of the DDC-treated samples from that of total SOD activity. CAT activity was assayed by a method based on the disappearance of  $H_2O_2$  at 240 nm (Pedraza-Chaverri et al., 2001). GPx activity was measured by a previously described method (Pedraza-Chaverri et al., 2001). GR activity was assayed by using oxidized glutathione as substrate and measuring the disappearance of NADPH at 340 nm (Carlberg and Mannervik, 1975).

#### Protein carbonyl content

Protein carbonyl groups were detected by its reactivity with DNPH to form protein hidrazones which were detected at 370 nm (Barrera et al., 2003).

#### Statistics

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by non-paired t test and one or two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test, as appropriate, using the software

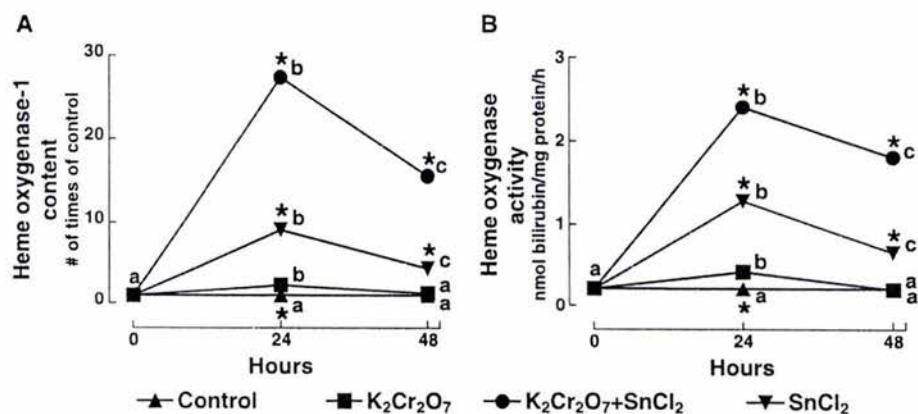


Fig. 1. (A) Densitometric quantitative analysis of HO-1 western blot and (B) HO activity in kidney from the four groups studied 24 and 48 h after  $K_2Cr_2O_7$  or vehicle injection.  $SnCl_2$  was given 12 h before  $K_2Cr_2O_7$  or vehicle injection. Mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$ /group. Groups with distinct letters are significantly different ( $p < 0.01$ ). \* $p < 0.05$  vs.  $K_2Cr_2O_7$  group at the corresponding time. The SEM is lower than the symbols size.

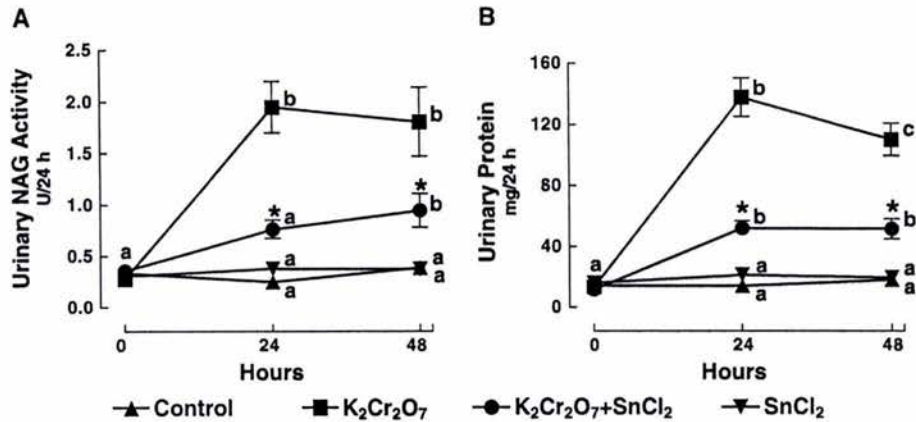


Fig. 2. Urinary excretion of (A) NAG and (B) total protein in the four groups studied 24 and 48 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. SnCl<sub>2</sub> was given 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. Mean  $\pm$  SEM. n = 5/group. Groups with distinct letters are significantly different (p < 0.05). \*p < 0.01 vs. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> group at the corresponding time. In some points the SEM is lower than the symbols size.

Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA). A p value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Kidney HO-1 content and HO activity

HO-1 was induced by administrating SnCl<sub>2</sub> (100 mg/Kg) 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> treatment. HO-1 content (Fig. 1A) and HO activity (Fig. 1B) were increased by SnCl<sub>2</sub> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub> and SnCl<sub>2</sub>

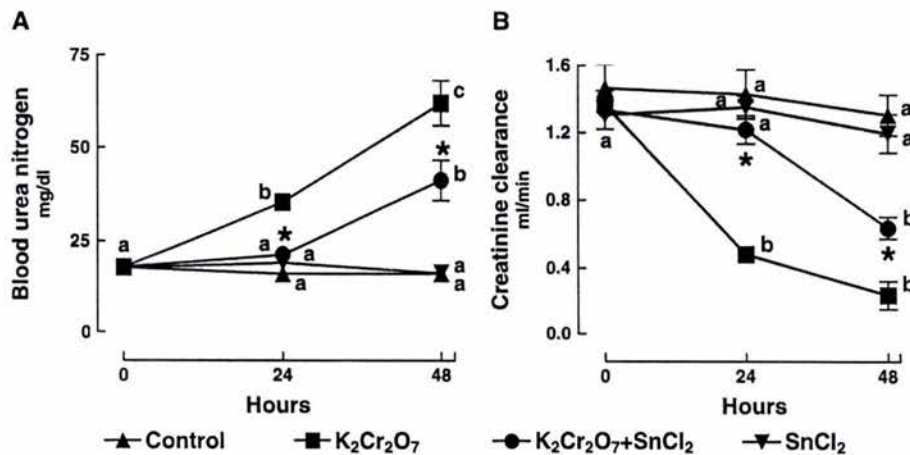


Fig. 3. (A) BUN and (B) creatinine clearance in the four groups studied 24 and 48 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. SnCl<sub>2</sub> was given 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. Mean  $\pm$  SEM. n = 5/group. Groups with distinct letters are significantly different (p < 0.05). \*p < 0.05 vs. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> group at the corresponding time. In some points the SEM is lower than the symbols size.

Table 1  
BUN/creatinine ratio in the four groups of rats studied 24 and 48 h after  $K_2Cr_2O_7$  or vehicle injection

	Time	Control	$K_2Cr_2O_7$	$K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$	$SnCl_2$
BUN/serum creatinine	0 hours	45.0 ± 2.8	45.7 ± 2.3	44.2 ± 2.7	47.2 ± 2.1
	24 hours	43.4 ± 2.4	40.9 ± 2.0	43.2 ± 2.6	43.2 ± 2.1
	48 hours	44.3 ± 2.2	43.9 ± 2.8	39.7 ± 2.5	48.0 ± 3.1

Mean ± SEM. n = 5 rats/group. p = NS.

groups) reaching a peak at 24 h. Values at 48 h were significantly higher than control but they were lower than the values at 24 h. The increase in HO activity and HO-1 content was significantly higher in the  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  group than in the  $K_2Cr_2O_7$  group. HO-1 content and HO activity were increased only at 24 h on the  $K_2Cr_2O_7$  group ( $p < 0.05$  vs. time 0).

#### NAG and total protein urinary excretion

NAG (Fig. 2A) and total protein (Fig. 2B) urinary excretion increased in  $K_2Cr_2O_7$  group at 24 (9.8- and 7.8-fold, respectively) and 48 h (6.0- and 4.6-fold, respectively). The increase in both parameters was partially prevented by  $SnCl_2$  treatment ( $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  group). The increase in urinary NAG in the  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  group was only significant at 48 h. Urinary excretion of NAG and total protein was similar in the CT and  $SnCl_2$  groups.

#### BUN, creatinine clearance and BUN/creatinine ratio

In the  $K_2Cr_2O_7$  group, BUN increased 2.2- and 3.8-fold at 24 and 48 h, respectively (Fig. 3A) and creatinine clearance decreased 66% and 82% at 24 and 48 h, respectively (Fig. 3B). These changes were completely prevented by  $SnCl_2$  pretreatment ( $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  group) at 24 h but only partially at 48 h. BUN and creatinine clearance were similar in CT and  $SnCl_2$  groups. BUN/creatinine ratio was similar in all groups studied (Table 1). These data indicate that the increase in BUN and creatinine were proportional in the experimental groups and that the rise in both parameters was consequence only of renal damage and not to extrarenal alterations (Feinfeld et al., 2002).

#### Histopathological and morphometric analysis

Histological analysis showed important damage in proximal tubular epithelial cells in the  $K_2Cr_2O_7$  group. Preinduction of HO-1 with  $SnCl_2$  significantly decreased the histological damage ( $K_2Cr_2O_7 +$

Table 2  
Quantitative histological analysis in the two  $K_2Cr_2O_7$ -treated groups studied 24 and 48 h after  $K_2Cr_2O_7$  injection.  $SnCl_2$  was given 12 h before  $K_2Cr_2O_7$

	Time	$K_2Cr_2O_7$	$K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$
Damaged tubules (% of total)	24 h	61.6 ± 2.7	25.3 ± 2.4*
	48 h	54.4 ± 1.9	42.2 ± 2.3*

Mean ± SEM. n = 5 rats/group (150 tubules). \* $p < 0.001$  vs.  $K_2Cr_2O_7$ .

Table 3

Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GR, CAT and GPx activities in kidney in the four groups studied 24 and 48 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection

	Time	Control	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> + SnCl <sub>2</sub>	SnCl <sub>2</sub>
Cu,Zn-SOD (U/mg protein)	24 h	11.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	12.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	13.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.6 <sup>a</sup>
	48 h	12.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.5 <sup>a</sup>
Mn-SOD (U/mg protein)	24 h	4.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.5 <sup>a</sup>
	48 h	4.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.3 <sup>a</sup>
GR (mU/mg protein)	24 h	80.4 ± 6.5 <sup>a</sup>	80.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	83.4 ± 2.9 <sup>a</sup>	77.8 ± 1.8 <sup>a</sup>
	48 h	78.6 ± 2.6 <sup>a</sup>	79.9 ± 4.7 <sup>a</sup>	79.6 ± 4.5 <sup>a</sup>	75.9 ± 2.2 <sup>a</sup>
CAT (k/mg protein)	24 h	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>
	48 h	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>b</sup>
GPx (U/mg protein)	24 h	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>
	48 h	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>

Mean ± SEM. n = 5/group. Groups with distinct letters are significantly different (p < 0.001).

SnCl<sub>2</sub> group) both at 24 and 48 h (Table 2). There were no renal histological alterations in the CT and SnCl<sub>2</sub> groups (data not shown).

#### Antioxidant enzymes

Renal activity of Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, and GR was similar in the four groups of rats studied both at 24 and 48 h (Table 3). At 48 h, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> induced a decrease of 25% and 40% in GPx and CAT activities, respectively, and only the GPx decrease was prevented by SnCl<sub>2</sub> pretreatment.

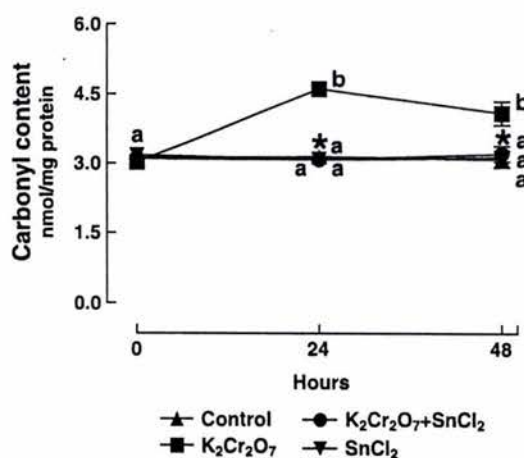


Fig. 4. Protein carbonyl content in kidney from the four groups studied 24 and 48 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. SnCl<sub>2</sub> was given 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. Mean ± SEM. n = 5/group. Groups with distinct letters are significantly different (p < 0.01). \*p < 0.01 vs. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> group at the corresponding time. In some points the SEM is lower than the symbols size.

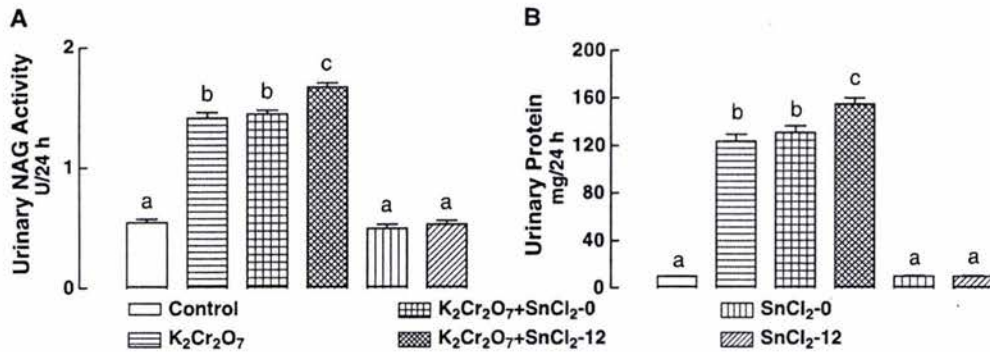


Fig. 5. Urinary excretion of (A) NAG and (B) total protein in the six groups studied 24 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. SnCl<sub>2</sub> was given at same time (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub>-0), or 12 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub>-12) or vehicle injection (SnCl<sub>2</sub>-0 and SnCl<sub>2</sub>-12). Mean  $\pm$  SEM. n = 5/group. Groups with distinct letters are significantly different (p < 0.01).

### Protein carbonyl content

Protein carbonyl content increased 1.5- and 1.3-fold in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-treated rats at 24 and 48 h, respectively (Fig. 4). This effect was completely prevented by SnCl<sub>2</sub> pretreatment (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub> group) at both times. Protein carbonyl content in the SnCl<sub>2</sub> group was similar to that of CT group (Fig. 4).

### Effect of SnCl<sub>2</sub> administration at 0 and 12 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> treatment on renal function

There was no protective effect when SnCl<sub>2</sub> was administered simultaneously with K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Urinary excretion of NAG (Fig. 5A) and total protein (Fig. 5B); and BUN (Fig. 6A) and serum creatinine (Fig. 6B) were similar in both groups (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub>-0 groups). When SnCl<sub>2</sub> was given 12 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> injection (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub>-12 group), renal damage, measured by these parameters, was significantly higher than in the K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> group (Figs. 5 and 6). Urinary NAG, urinary protein, BUN and serum creatinine increased 1.2-, 1.3-, 1.5-, and 1.5-fold, respectively in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub>-12 groups

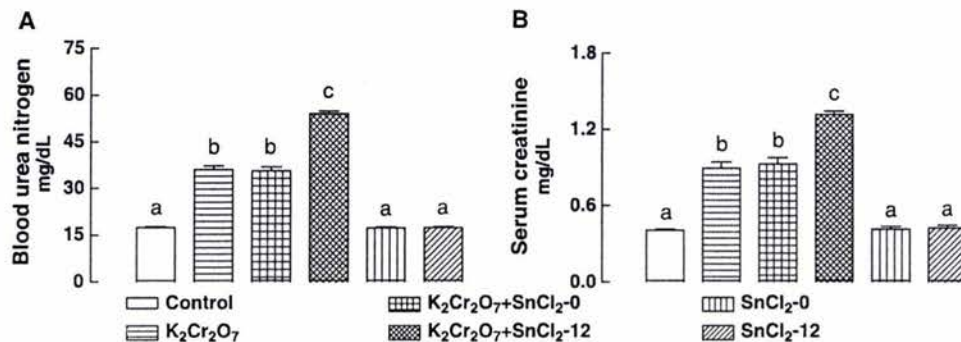


Fig. 6. (A) BUN, and (B) serum creatinine in the six groups studied 24 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> or vehicle injection. SnCl<sub>2</sub> was given at same time (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub>-0), or 12 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub>-12) or vehicle injection (SnCl<sub>2</sub>-0 and SnCl<sub>2</sub>-12). Mean  $\pm$  SEM. n = 5/group. Groups with distinct letters are significantly different (p < 0.001).

Table 4

BUN/creatinine ratio in the six groups of rats studied 24 h after  $K_2Cr_2O_7$  injection

	Control	$K_2Cr_2O_7$	$K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-0$	$K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-12$	$SnCl_2-0$	$SnCl_2-12$
BUN/serum creatinine	$43.4 \pm 1.2$	$40.9 \pm 3.0$	$39.0 \pm 2.5$	$41.0 \pm 1.0$	$42.3 \pm 2.9$	$41.4 \pm 2.3$

Mean  $\pm$  SEM. n = 5 rats/group. p = NS.

compared to  $K_2Cr_2O_7$  group (Figs. 5 and 6). BUN/creatinine ratio was not significantly different among the six groups of rats studied (Table 4).

#### Effect of $SnCl_2$ administration 0 and 12 h after $K_2Cr_2O_7$ treatment on renal structure

Animals exclusively treated with  $SnCl_2$  did not show any histological abnormality. In contrast, the administration of  $K_2Cr_2O_7$  produced extense damage in epithelial cells from proximal convoluted tubules, characterized by vacuolization, necrosis and cell detachment. Interestingly, when  $K_2Cr_2O_7$  and  $SnCl_2$  were administered at the same time ( $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-0$  group), numerous convoluted tubules showed vacuolated and necrotic cells in coexistence with other tubules which had abundant necrotic cells with picnotic nucleus and deep acidophilic cytoplasm, some of these tubules had occasional luminal cylinders. When the  $SnCl_2$  was administered 12 hours after  $K_2Cr_2O_7$  ( $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-12$  group), more necrotic acidophilic cells and intraluminal cylinders were seen (data not shown). It is important to point out that some alterations such as deep acidophilic cytoplasm, luminal cylinders and picnotic nucleus were not observed when rats were treated only with  $K_2Cr_2O_7$ .

#### Effect of $SnCl_2$ administration at 0 and 12 h after $K_2Cr_2O_7$ treatment on renal HO-1 and protein carbonyl content

Renal HO-1 content increased in all experimental groups, however the increase in  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-0$  and  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-12$  was markedly lower than the increase in  $SnCl_2-0$  and  $SnCl_2-12$  groups and significantly higher than the increase in  $K_2Cr_2O_7$  group (Fig. 7A). Carbonyl content increased in  $K_2Cr_2O_7$  group and this increase was not prevented neither in  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-0$  nor in  $K_2Cr_2O_7 +$

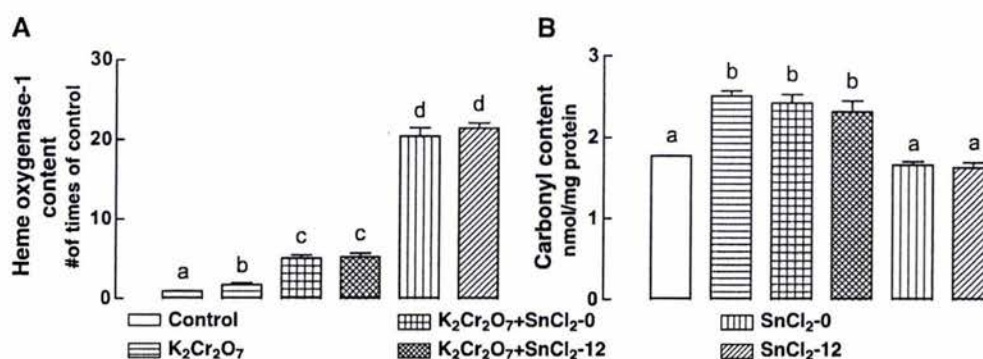


Fig. 7. (A) Heme oxygenase-1 content and (B) carbonyl content in the six groups of rats studied 24 h after  $K_2Cr_2O_7$  or vehicle injection.  $SnCl_2$  was given at same time ( $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-0$ ), or 12 h after  $K_2Cr_2O_7$  ( $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-12$ ) or vehicle injection ( $SnCl_2-0$  and  $SnCl_2-12$ ). Mean  $\pm$  SEM. n = 5/group. Groups with distinct letters are significantly different (p < 0.001).

SnCl<sub>2</sub>-12 groups (Fig. 7B). Carbonyl content in control, SnCl<sub>2</sub>-0, and SnCl<sub>2</sub>-12 groups was similar. These findings are in clear contrast to those observed when SnCl<sub>2</sub> was given 12 hours before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (see Figs. 1 and 4) where it was found that HO-1 content is significantly higher in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + SnCl<sub>2</sub> group than in SnCl<sub>2</sub> group (Fig. 1) and the increase in carbonyl content in K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> group is prevented by SnCl<sub>2</sub> pretreatment (Fig. 4).

## Discussion

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> is a chemical compound that is widely used in metallurgy, chrome plating, chemical industry, textile manufacture, wood preservation, photography and photoengraving, refractory and stainless steel industry, and cooling systems (Barceloux, 1999). Occupational exposure to chromium has been associated with welders, chrome-plating workers, and chromium pigment factories workers (Verschoor et al., 1988). Chromium is known to cause allergic dermatitis (Ingber et al., 1988), carcinogenicity (Norseth, 1986), and ARF in humans (Picaud et al., 1991; Sharma et al., 1978; Verschoor et al., 1988) and in animals (Michael et al., 1991; Pedraza-Chaverri et al., 1995b; Seiken et al., 1994). ROS has been involved in the pathophysiology of ARF induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and some antioxidants are able to ameliorate renal damage induced by this compound (Appenroth and Winnefeld, 1998; Barrera et al., 2003; Huang et al., 1999; Na et al., 1992; Sengupta et al., 1992).

We have previously shown that HO-1 preinduction by SnCl<sub>2</sub> ameliorates ARF and prevents oxidative stress induced 24 h after K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> injection. In this work we explored if other antioxidant enzymes could be involved in the protective effect of SnCl<sub>2</sub> and the possible protective effect of this compound at 48 h after the single K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> injection. Our data show that the protection induced by a single injection SnCl<sub>2</sub> 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> treatment is present not only at 24 h but also at 48 h. The major protection was observed at 24 h and correlated with the time of major HO-1 expression (Figs. 1, 2, and 3). At 48 h, the decrease in HO-1 expression and HO activity is associated with the decrease in the protective effect. The protective effect, evaluated by measuring BUN and creatinine clearance, decreased from 73% at 24 h to 45% at 48 h and from 79% at 24 h to 37% at 48 h, respectively. The protective effect, evaluated by measuring structural damage, also decreased from 60% at 24 h to 22% at 48 h. In contrast, the protective effect, evaluated by measuring urinary excretion of NAG and total protein, decreased only slightly: from 70% at 24 h to 61% at 48 h and from 70% at 24 h to 63% at 48 h, respectively. Interestingly, protein carbonyl content in kidney, a marker of oxidative stress, also was ameliorated by SnCl<sub>2</sub> at 24 and 48 h, which is consistent with our previous work performed at 24 h (Barrera et al., 2003). Other authors also have found that the preinduction of HO-1 with SnCl<sub>2</sub> has a protective effect in renal ischemia-reperfusion damage (Toda et al., 2002), cardiac hypertrophy in genetically hypertensive rats (Seki et al., 1999), and corneal inflammation (Laniado-Schwartzman et al., 1997).

On the other hand, in this work, SnCl<sub>2</sub> was able to increase HO-1 activity but not that of any other antioxidant enzyme studied, therefore, we were unable to find an association between the activity of these antioxidant enzymes (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GR, and CAT) and the protective effect of SnCl<sub>2</sub>. It is clear from our data that the renoprotective effect of SnCl<sub>2</sub>, given 12 h before K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> injection, is associated to the increase of HO-1 and not to the increase in other antioxidant enzymes. In other models of renal damage, enhanced expression of some antioxidant enzymes has a beneficial effect. For example, the overexpression or enhanced activity of Cu,Zn-SOD (Nakajima et al., 1994; Yin et al., 2001; Zhong et al., 2001), Mn-SOD (Davis et al., 2001; Yoshioka et al., 1990), GPx (Yoshioka et al., 1990), and catalase



(Yoshioka et al., 1990) is able to protect from renal damage in the following experimental models of nephrotoxicity associated to oxidative stress: cisplatin (Davis et al., 2001), ischemia-reperfusion (Yin et al., 2001; Yoshioka et al., 1990), gentamicin (Nakajima et al., 1994), and cyclosporine (Zhong et al., 2001). Furthermore, GPx activity decreased in  $K_2Cr_2O_7$  treated rats at 48 h which could be secondary to the increase in peroxynitrite (Padmaja et al., 1998) or superoxide anion (Blum and Fridovich, 1985), which are enhanced by  $K_2Cr_2O_7$  treatment (Barrera et al., 2003; Pritchard et al., 2000). The protective effect of  $SnCl_2$  on GPx activity (Table 2) could be related to its ability to ameliorate oxidative stress (See Fig. 4 and Barrera et al., 2003).

We found that HO-1 content in  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2$  group was significantly higher than the increase in  $SnCl_2$  group. The synergism of two substances on HO-1 induction has also been observed by others. Cable et al. (1990) found a synergistic induction of HO-1 by iron and glutethimide in chick embryo liver cells. They found that this synergism was heme dependent. Furthermore, Sunderman (1987) found that the synergism of nickel and diethyldithiocarbamate on HO activity may be attributable, at least in part, to the enhanced cellular uptake of nickel. Additional experiments should be done to establish the mechanism by which  $SnCl_2$  and  $K_2Cr_2O_7$  exert a synergistic effect on HO-1.

In addition, we explored if HO-1 induction is able to ameliorate renal damage when the enzyme is induced at the same time (injecting  $SnCl_2$  and  $K_2Cr_2O_7$  at the same time) or when damage has already been induced (injecting  $SnCl_2$  12 h after  $K_2Cr_2O_7$  injection). The experiments showed that when  $SnCl_2$  and  $K_2Cr_2O_7$  were injected at the same time there was no protective effect, and when  $SnCl_2$  was injected 12 h after  $K_2Cr_2O_7$ , the damage was exacerbated. This observation has strong implications because HO-1 induction is only protective if it is induced before  $K_2Cr_2O_7$  damage and may even be able to exacerbate renal damage if it is induced after  $K_2Cr_2O_7$  damage. This lack of protection is associated with the impaired ability of kidneys to synthesize HO-1 in response to  $SnCl_2$ . HO-1 induction was significantly lower in  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-0$  and  $K_2Cr_2O_7 + SnCl_2-12$  groups than in  $SnCl_2-0$  and  $SnCl_2-12$  groups (see Fig. 7A) and with the inability of  $SnCl_2$  to prevent the rise in protein carbonyl content in  $K_2Cr_2O_7$ -treated groups. The mechanism by which  $SnCl_2$  injection exacerbates renal damage under these conditions is not known at present.

In summary: (a) the time-course of  $SnCl_2$  protective effect was associated with HO-1 expression, (b) HO-1 preinduction is indispensable in the protective effect of  $SnCl_2$  on  $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity, and (c) there was no association between the amelioration of  $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity by  $SnCl_2$  and the renal activities of Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GR, and CAT.

## Conclusion

The protective effect of  $SnCl_2$  on  $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity is associated with HO-1 induction and not to other antioxidant enzymes (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GR, and CAT) and  $SnCl_2$  has a preventive and not a therapeutic effect on renal damage induced by  $K_2Cr_2O_7$ .

## Acknowledgements

This work was supported by CONACYT (#25441), DGAPA (IN210201) and PAEP (203307). DB received a scholarship from CONACYT (#129718) and DGAPA (#5991701).

## References

- Agarwal, A., Balla, J., Alam, J., Croatt, A.J., Nath, K.A., 1995. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney International* 48 (4), 1298–1307.
- Aiyar, J., Berkovits, H.J., Floyd, R.A., Wetterhahn, K.E., 1991. Reaction of chromium (VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium (VI)-induced DNA damage. *Environmental Health Perspectives* 92, 53–62.
- Appenroth, D., Winnefeld, K., 1998. Vitamin E and C in the prevention of metal nephrotoxicity in developing rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 50 (4–6), 391–396.
- Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M., Preuss, H.G., 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180 (1), 5–22.
- Barceloux, D.G., 1999. Chromium. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 37 (2), 173–194.
- Barrera, D., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., Pedraza-Chaverri, J., 2003. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by  $K_2Cr_2O_7$ . *Free Radical Biology and Medicine* 34 (11), 1390–1398.
- Berry, J.P., Hourdry, J., Galle, P., Lagrue, G., 1978. Chromium concentration by proximal renal tubule cells: an ultrastructural, microanalytical and cytochemical study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 26 (8), 651–657.
- Blum, J., Fridovich, I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240 (2), 500–508.
- Cable, E., Greene, Y., Healey, J., Evans, C.O., Bonkovsky, H., 1990. Mechanism of synergistic induction of hepatic heme oxygenase by glutethimide and iron: studies in cultured chick embryo liver cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168 (1), 176–181.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250 (14), 5475–5480.
- Da Silva, J.L., Zand, B.A., Yang, L.M., Sabaawy, H.E., Lianos, E., Abraham, N.G., 2001. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the kidney. *Kidney International* 59 (4), 1448–1457.
- Davis, C.A., Nick, H.S., Agarwal, A., 2001. Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *Journal of the American Society of Nephrology* 12 (12), 2683–2690.
- de Cavanagh, E.M., Inserra, F., Ferder, L., Fraga, C.G., 2000. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278 (3), R572–R577.
- Evan, A.P., Dail Jr., W.G., 1974. The effects of sodium chromate on the proximal tubules of the rat kidney. Fine structural damage and lysozymuria. *Laboratory Investigation* 30 (6), 704–715.
- Feinfeld, D.A., Bargouthi, H., Niaz, Q., Carvounis, C.P., 2002. Massive and disproportionate elevation of blood urea nitrogen in acute azotemia. *International Urology and Nephrology* 34 (1), 143–145.
- Franchini, I., Mutti, A., Cavatorta, A., Corradi, A., Cosi, A., Olivetti, G., Borghetti, A., 1978. Nephrotoxicity of chromium. Remarks on an experimental and epidemiological investigation. *Contributions to Nephrology* 10, 98–110.
- Hojo, Y., Satomi, Y., 1991. In vivo nephrotoxicity induced in mice by chromium(VI). Involvement of glutathione and chromium(V). *Biological Trace Element Research* 31 (1), 21–31.
- Huang, Y.L., Chen, C.Y., Sheu, J.Y., Chuang, I.C., Pan, J.H., Lin, T.H., 1999. Lipid peroxidation in workers exposed to hexavalent chromium. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 56 (4), 235–247.
- Ingber, A., Gammelgaard, B., David, M., 1988. Detergents and bleaches are sources of chromium contact dermatitis in Israel. *Contact Dermatitis* 38 (2), 101–104.
- Kanakiriya, S., Nath, K., 2001. Heme oxygenase and acute renal injury. In: Molitoris, B.A., Finn, W.F. (Eds.), *Acute renal failure. A companion to Brenner and Rector's The kidney*. W.B. Saunders Company Press, Philadelphia, pp. 78–88.
- Kawamura, T., Yoshioka, T., Bills, T., Fogo, A., Ichikawa, I., 1991. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney International* 40 (2), 291–301.
- Laniado-Schwartzman, M., Abraham, N.G., Connors, M., Dunn, M.W., Levere, R.D., Kappas, A., 1997. Heme oxygenase induction with attenuation of experimentally induced corneal inflammation. *Biochemical Pharmacology* 53 (8), 1069–1075.
- Liu, K.J., Shi, X., 2001. In vivo reduction of chromium (IV) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 222 (1–2), 41–47.

- Liu, K.J., Shi, X., Dalal, N.S., 1997. Synthesis of Cr(VI)–GSH, its identification and its free hydroxyl radical generation: a model compound for Cr(VI) carcinogenicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 235 (1), 54–58.
- Michael, U.F., Logan, J.L., Meeks, L.A., 1991. The beneficial effects of thyroxine on nephrotoxic acute renal failure in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology* 1 (11), 1236–1240.
- Na, K.J., Jeong, S.Y., Lim, C.H., 1992. The role of glutathione in the acute nephrotoxicity of sodium dichromate. *Archives of Toxicology* 66 (9), 646–651.
- Nakajima, T., Hishida, A., Kato, A., 1994. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *American Journal of Physiology* 266 (3 Pt 2), F425–F431.
- Nath, K.A., Balla, G., Vercellotti, G.M., Balla, J., Jacob, H.S., Levitt, M.D., Rosenberg, M.E., 1992. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *Journal of Clinical Investigation* 90 (1), 267–270.
- Nath, K.A., Haggard, J.J., Croatt, A.J., Grande, J.P., Poss, K.D., Alam, J., 2000. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *American Journal of Pathology* 156 (5), 1527–1535.
- Nath, K.A., Norby, S.M., 2000. Reactive oxygen species and acute renal failure. *American Journal of Medicine* 109 (8), 665–678.
- Nath, K.A., Paller, M.S., 1990. Dietary deficiency of antioxidants exacerbates ischemic injury in the rat kidney. *Kidney International* 38 (6), 1109–1117.
- Nishimura, Y., Nakayama, M., Sato, T., Tomita, K., Inoue, M., 1995. Inhibition of puromycin-induced renal injury by a superoxide dismutase derivative with prolonged in vivo half-life. *Nephron* 70 (4), 460–465.
- Norseth, T., 1986. The carcinogenicity of chromium and its salts. *British Journal of Industrial Medicine* 43 (10), 649–651.
- Ó'Brien, P., Kortenkamp, A., 1994. Chemical models important in understanding the ways in which chromate can damage DNA. *Environmental Health Perspectives* 102 (Suppl. 3), 3–10.
- Padmaja, S., Squadrito, G.L., Pryor, W.A., 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349 (1), 1–6.
- Paller, M.S., 1991. Hydrogen peroxide and ischemic renal injury: effect of catalase inhibition. *Free Radical Biology and Medicine* 10 (1), 29–34.
- Pedraza-Chaverri, J., Arevalo, A.E., Hernandez-Pando, R., Larriva-Sahd, J., 1995a. Effect of dietary antioxidants on puromycin aminonucleoside nephrotic syndrome. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 27 (7), 683–691.
- Pedraza-Chaverri, J., Granados-Silvestre, M.D., Medina-Campos, O.N., Hernandez-Pando, R., 1999. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radical Biology and Medicine* 27 (3–4), 245–253.
- Pedraza-Chaverri, J., Granados-Silvestre, M.A., Medina-Campos, O.N., Maldonado, P.D., Olivares-Corichi, I.M., Ibarra-Rubio, M.E., 2001. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 216 (1–2), 9–19.
- Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Olivares-Corichi, I.M., Granados-Silvestre, M.A., Hernandez-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 29 (7), 602–611.
- Pedraza-Chaverri, J., Moreno-Muñiz, S.I., Cruz, C., Hernández-Pando, R., Larriva-Sahd, J., Tapia, E., 1995b. Urinary angiotensin I-converting enzyme activity is increased in experimental acute renal failure. *Clinical and Investigative Medicine* 18 (6), 424–434.
- Pedraza-Chaverri, J., Tapia, E., Bobadilla, N., 1992. Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the spin-trapping agent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Renal Failure* 14 (4), 467–471.
- Picaud, J.C., Cochat, P., Parchoux, B., Berthier, J.C., Gilly, J., Chareyre, S., Larbre, F., 1991. Acute renal failure in a child after chewing of match heads. *Nephron* 57 (2), 225–226.
- Pritchard Jr., K.A., Ackerman, A., Kalyanaraman, B., 2000. Chromium (VI) increases endothelial cell expression of ICAM-1 and decreases nitric oxide activity. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 19 (3), 251–260.
- Rodrigo, R., Rivera, G., 2002. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radicals and Biology Medicine* 33 (3), 409–422.
- Seiken, G., Grillo, F.G., Schaudies, R.P., Johnson, J.P., 1994. Modulation of renal EGF in dichromate-induced acute renal failure treated with thyroid hormone. *Kidney International* 45 (6), 1622–1627.
- Seki, T., Naruse, M., Naruse, K., Yoshimoto, T., 1999. Induction of heme oxygenase produces load-independent cardioprotective effects in hypertensive rats. *Life Sciences* 65 (10), 1077–1086.
- Sengupta, T., Chattopadhyay, D., Ghosh, N., Maulik, G., Chatterjee, G.C., 1992. Impact of chromium on lipoperoxidative

- processes and subsequent operation of the glutathione cycle in rat renal system. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 29 (3), 287–290.
- Seth, P., Kumari, R., Madhavan, S., Singh, A.K., Mani, H., Banaudha, K.K., Sharma, S.C., Kulshreshtha, D.K., Maheshwari, R.K., 2000. Prevention of renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats by picroliv. *Biochemical Pharmacology* 59 (10), 1315–1322.
- Sharma, B.K., Singhal, P.C., Chugh, K.S., 1978. Intravascular haemolysis and renal failure following potassium dichromate poisoning. *Postgraduate Medical Journal* 54 (632), 414–415.
- Shi, X.L., Dalal, N.S., 1990. Evidence for a Fenton type mechanism for the generation of OH radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 281 (1), 90–95.
- Shi, X., Dalal, N.S., 1994. Generation of hydroxyl radical by chromate in biologically relevant systems: role of Cr(VI) complex versus tetraperochromate(V). *Environmental Health Perspectives* 102 (Suppl. 3), 231–236.
- Shiraishi, F., Curtis, L.M., Truong, L., Poss, K., Visner, G.A., Madsen, K., Nick, H.S., Agarwal, A., 2000. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 278 (5), F726–F736.
- Standeven, A.M., Wetterhahn, K.E., 1991. Possible role of glutathione in chromium(VI) metabolism and toxicity in rats. *Pharmacology and Toxicology* 68 (6), 469–476.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18 (2), 321–336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 19 (3), 201–213.
- Sugiyama, M., 1992. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radical Biology and Medicine* 12 (5), 397–407.
- Sunderman Jr., F.W. 1987. Metal induction of heme oxygenase. *Annual New York Academy of Sciences* 514, 65–80.
- Suttner, D.M., Dennery, P.A., 1999. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *The FASEB Journal* 13 (13), 1800–1809.
- Toda, N., Takahashi, T., Mizobuchi, Z., Fujii, H., Nakahira, K., Takahashi, S., Yamashita, M., Morita, K., Hirakawa, M., Akagi, R., 2002. Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Critical Care Medicine* 30 (7), 1512–1522.
- Tsou, T.C., Chen, C.L., Liu, T.Y., Yang, J.L., 1996. Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* 17 (1), 103–108.
- Ueda, N., Mayeux, P.R., Baliga, R., Shah, S.V., 2001. Oxidant mechanisms in acute renal failure. In: Molitoris, B.A., Finn, W.F. (Eds.), *Acute renal failure. A companion to Brenner and Rector's The kidney*. W.B. Saunders Company Press, Philadelphia, pp. 60–77.
- Verschoor, M.A., Bragt, P.C., Herber, R.F., Zielhuis, R.L., Zwennis, W.C., 1988. Renal function of chrome-plating workers and welders. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 60 (1), 67–70.
- Yin, M., Wheeler, M.D., Connor, H.D., Zhong, Z., Bunzendahl, H., Dikalova, A., Samulski, R.J., Schoonhoven, R., Mason, R.P., Swenberg, J.A., Thurman, R.G., 2001. Cu/Zn-superoxide dismutase gene attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 12 (12), 2691–2700.
- Yoneya, R., Ozasa, H., Nagashima, Y., Koike, Y., Teraoka, H., Hagiwara, K., Horikawa, S., 2000. Hemin pretreatment ameliorates aspects of the nephropathy induced by mercuric chloride in the rat. *Toxicology Letters* 116 (3), 223–229.
- Yoshioka, T., Bills, T., Moore-Jarrett, T., Greene, H.L., Burr, I.M., Ichikawa, I., 1990. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney International* 38 (2), 282–288.
- Zhong, Z., Connor, H.D., Yin, M., Wheeler, M.D., Mason, R.P., Thurman, R.G., 2001. Viral delivery of superoxide dismutase gene reduces cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *Kidney International* 59 (4), 1397–1404.