

00581



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

LA S-ALILCISTEÍNA Y EL EXTRACTO DE
AJO ENVEJECIDO ATENÚAN LA
NEFROPATÍA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO
INDUCIDOS POR GENTAMICINA EN
RATAS

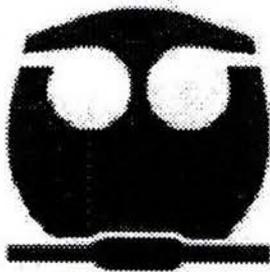
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

PERLA DEYANIRA MALDONADO
JIMÉNEZ

Tutor: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ



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.

LA S-ALILCISTEÍNA Y EL EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO ATENÚAN LA NEFROPATÍA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDOS POR GENTAMICINA EN RATAS

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverrí en el Laboratorio de Bioquímica Clínica, del 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:

Dra. Rachel Mata Essayag	Facultad de Química, UNAM
Dr. José Pedraza Chaverrí	Facultad de Química, UNAM
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Rachel Mata Essayag del Edificio de Bioquímica y Farmacia, conjunto "E", Facultad de Química, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se reconoce la colaboración del Dr. Alejandro Zentella Dehesa del Instituto de Fisiología Celular y del Dr. Marco A. Velasco Velázquez del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos *in vitro* (cultivo celular).

Se reconoce la asesoría de la M. en C. Isabel Rivero Cruz, Técnico Académico Titular "A" de la Dra. Rachel Mata Essayag en los experimentos de HPLC y del Biól. Luciano Hernández Gómez, Jefe del Cepario, Facultad de Química en la realización del antibiograma.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (34920-M, 40009-M) y PAEP-UNAM (103333, 203308). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (#124981) y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Rachel Mata Essayag	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Francisco Javier Placencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM



ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
1. Gentamicina	3
1.1 Estructura química	3
1.2 Farmacocinética	4
1.3 Mecanismo de entrada a las células tubulares	4
1.4 Patología	5
1.5 Toxicidad	6
1.6 Mecanismo de inducción de la nefrotoxicidad	8
2. El riñón	9
2.1 Nefrona	10
2.2 Células tubulares proximales	10
3. Radicales libres de oxígeno y defensas antioxidantes	11
3.1 Superóxido dismutasa (Óxido reductasa EC 1.15.1.1)	11
3.2 Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)	12
3.3 Glutatión peroxidasa (GPx)	12
4. El ajo	12
4.1 Extracto de ajo envejecido (EAE)	15
5. Estudios en células LLC-PK ₁	17
IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	18
V. HIPÓTESIS	20
VI. OBJETIVOS	21
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	22
1. Reactivos	22
2. Estudios <i>in vivo</i>	23
2.1 Diseño experimental con extracto de ajo envejecido (EAE)	23
2.2 Diseño experimental con diferentes dosis de S-alilcisteína (SAC)	24
2.3 Diseño experimental con SAC	24
2.4 Síntesis de SAC	25
2.5 Métodos empleados	25
2.5.1 Evaluación de la capacidad antioxidante del EAE y la SAC	25
1. Anión superóxido (O ₂ ⁻)	25
A. Método enzimático	25
B. Método no enzimático	26
2. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	26
3. Radical hidroxilo (OH)	27
3. Radical ABTS	27
2.5.2 Evaluación de la función renal	28
1. Función tubular	28
A. Cuantificación de proteínas en la orina	28



ÍNDICE

B. Actividad de la N-acetil-b-D-glucosaminidasa (NAG) en la orina	28
C. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en suero	29
D. Cuantificación del daño tubular por microscopia de luz	29
2. Función glomerular	30
A. Creatinina en el suero	30
B. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	31
2.5.3 Evaluación del estrés oxidativo en la corteza renal	31
1. Contenido de grupos carbonilo en las proteínas (proteínas oxidadas)	31
2. Contenido de nitrotirosina y de 4-hidroxinonenal (4-HNE) por inmunohistoquímica	32
2.5.4 Actividad y cantidad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal	33
1. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	33
A. SOD total	33
B. SOD de manganeso (Mn-SOD)	34
C. SOD de cobre y zinc (CuZn-SOD)	34
2. Actividad de la catalasa (CAT)	34
3. Actividad de la GPx	34
4. Actividad de la glutatión reductasa (GR)	35
5. Cantidad de las enzimas antioxidantes por western blot	35
6. Cuantificación de proteínas en el riñón	36
2.5.5 Determinación del contenido de GM en la corteza renal	36
2.5.6 Análisis estadístico	37
2.5.7 Efecto de la SAC sobre la capacidad bactericida de la GM	37
3. Identificación de la alicina y la SAC por HPLC	37
3.1 Identificación de la alicina en un extracto acuoso de ajo (EAA)	37
3.1.1 Preparación del EAA a partir de polvo de ajo	37
3.1.2 Identificación de la alicina	38
3.2 Identificación de la SAC en el EAE	38
3.2.1 Reacción de derivatización e identificación de la SAC	38
4. Estudios <i>in vitro</i>	39
4.1 Cultivo de las células LLC-PK ₁	39
4.2 Estudio dosis-respuesta con GM	39
4.3 Efecto del EAA, el EAE, la alicina, la alicina y la SAC	40
4.4 Efecto del EAA, el EAE, la alicina, la SAC y la NAC administrados 12 h antes de la GM	41
4.5 Métodos empleados	42
4.5.1 Viabilidad celular por cristal violeta	42
4.5.2 Análisis estadístico	42
VIII. RESULTADOS	43
1. Estudios <i>in vivo</i>	43
1.1 Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE)	43
1.1.1 Capacidad antioxidante del EAE	43
1. Anión superóxido (O ₂ ⁻)	43
2. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	44
3. Radical hidroxilo (OH)	44
1.1.2 Evaluación de la función renal	45
1. Función tubular	45
A. Excreción de NAG y de proteínas en la orina	45
B. Actividad de GPx en suero	45



C. Cuantificación del daño tubular	46
2. Función glomerular	46
A. Creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN)	46
1.1.3 Evaluación del estrés oxidativo en la corteza renal	47
1. Contenido de grupos carbonilo en las proteínas	47
2. Contenido de nitrotirosina	48
1.1.4 Actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal	49
1.1.5 Cantidad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal	49
1.1.6 Contenido de GM en la corteza renal	50
1.2 Efecto de la S-alilcisteína (SAC)	51
1.2.1 Identificación de la SAC obtenida por síntesis química	51
1.2.2 Capacidad antioxidante de la SAC obtenida por síntesis química	51
1. Anión superóxido (O ₂ ⁻) y Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	51
2. Radical hidroxilo (OH) y radical ABTS	52
1.2.3 Efecto de diferentes dosis de SAC	53
1.2.4 Peso corporal y volumen urinario	54
1.2.5 Evaluación de la función renal	54
1. Función tubular	54
A. Excreción de NAG y de proteínas en la orina	54
B. Actividad de GPx en suero	55
C. Cuantificación del daño tubular	55
2. Función glomerular	56
A. Creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN)	56
1.2.6 Evaluación del estrés oxidativo en la corteza renal	57
1. Contenido de grupos carbonilo en las proteínas	57
2. Contenido de nitrotirosina	58
3. Contenido de 4-hidroxinonenal (4-HNE)	58
1.2.7 Actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal	59
1. Superóxido dismutasa (SOD)	59
2. Catalasa (CAT)	60
3. Glutación peroxidasa (GPx) y glutación reductasa (GR)	60
1.2.8 Efecto de la SAC sobre la capacidad bactericida de la GM	61
2. Identificación de la alicina y la S-alilcisteína (SAC) en el ajo por HPLC	62
2.1 Identificación de la alicina en un extracto acuoso de ajo (EAA)	62
2.2 Identificación de la SAC en un extracto de ajo envejecido (EAE)	64
3. Estudios <i>in vitro</i>	65
3.1 Estudio dosis-respuesta con GM	65
3.2 Efecto del EAA, el EAE, la alina, la alicina y la SAC	65
3.3 Efecto del EAA, el EAE, la alina, la SAC y la NAC administrados 12 h antes de la GM	67
IX. DISCUSIÓN	68
X. CONCLUSIONES	76
XI. PERSPECTIVAS	77
XII. BIBLIOGRAFÍA	78
XIII. APÉNDICE	89



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS GENERALES

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CuZn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y de zinc
DADS	Dialdisulfuro
DAS	Dialilsulfuro
DATS	Dialitrisulfuro
DO	Densidad óptica
EAA	Extracto acuoso de ajo
EAE	Extracto de ajo envejecido
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
GM	Gentamicina
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GRF	Velocidad de filtración glomerular
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H&E	Hematoxilina y eosina
HO	Hemo oxigenasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IRA	Insuficiencia renal aguda
LDL	Lipoproteínas de bajo peso molecular
LPx	Lipoperoxidación
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidasa
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH	Radical Hidroxilo
ON	Óxido nítrico
Px	Peroxiredoxinas
SAC	S-alilcisteína
SAC-St	S-alilcisteína estándar
SAMC	S-alilmercaptocisteína



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN MÉTODOS

ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
CuCl ₂	Cloruro cúprico
D ₂ O	Agua deuterada
DAB	Diaminobencidina
DDC	Dietilditiocarbamato
DFO	Deferoxamina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico); 4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
NaCl	Cloruro de sodio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotidamina adenina dinucleótido, reducida
NADPH	Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato, reducida
NBT	Nitrozul de tetrazolio
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PITC	Fenilisotiocianato
PMS	Fenasina metosulfato
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SSI	Solución salina isotónica, NaCl 0.9%
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilendiamina

**I. RESUMEN**

La insuficiencia renal aguda (IRA) es la mayor complicación del tratamiento con la gentamicina (GM), la cual es efectiva contra infecciones causadas por bacterias Gram negativas. Diversas evidencias experimentales sugieren un papel de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) en la IRA inducida por GM. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos el efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) y de un compuesto derivado de este, la S-alilcisteína (SAC), los cuales muestran propiedades antioxidantes, sobre la nefrotoxicidad inducida por GM. En las ratas tratadas con GM (70 mg/Kg/12 h/4 días/s.c.), la IRA fue evidente por: 1) el incremento en el nitrógeno de urea en sangre y la creatinina en el suero, 2) la disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en el suero y el aumento en la excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa y de proteínas totales y 3) la necrosis de las células de los túbulos proximales. Estas alteraciones fueron prevenidas por el tratamiento con EAE (1.2 mL/kg/12 h/6 días/i.p., el cual se inició 2 días antes de la primera dosis de GM) y con SAC (250 mg/Kg/i.p. 24 h antes de la primera dosis de GM y 125 mg/Kg/12 h/4 días a lo largo del tratamiento con GM). Además, el EAE y la SAC previnieron el estrés oxidativo inducido por la GM (el cual fue evaluado por los niveles de: grupos carbonilo, nitrotirosina y 4-hidroxinonal en las proteínas); así como, la disminución en la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), la GPx y la glutatión reductasa (GR) en la corteza renal. En conclusión, el efecto protector del EAE estuvo asociado con la disminución del estrés oxidativo y con la preservación de la actividad de las enzimas Mn-SOD, GPx y GR en la corteza renal y no con cambios en el contenido renal de GM. Por otro lado, la SAC disminuyó la IRA inducida por la GM, a través de un mecanismo relacionado, al menos en parte, con su capacidad para disminuir el estrés oxidativo y preservar la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal. Además, la SAC protege contra la nefrotoxicidad inducida por la GM sin afectar su actividad bactericida. Estos datos sugieren que el EAE y la SAC podrían ser agentes útiles en la prevención de la nefrotoxicidad inducida por la GM.



ABSTRACT

II. ABSTRACT

Acute renal failure (ARF) is a major complication of gentamicin (GM) treatment, which is effective against Gram-negative infections. Since experimental evidences suggest a role of reactive oxygen species (ROS) in GM-induced ARF, in this work we studied the effect of an aged garlic extract (AGE), and the garlic-derived compound, S-allylcysteine (SAC), which have antioxidant properties, on GM-induced nephrotoxicity. In rats treated with GM (70 mg/Kg/12 h/4 days/s.c.), ARF was evident by the: 1) an increase in blood urea nitrogen and serum creatinine, 2) a decrease in serum glutathione peroxidase (GPx) activity and an increase in urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and total protein, and 3) necrosis of proximal tubular cells. These alterations were prevented by AGE (1.2 mL/kg/12 hours/6 days/i.p., which started two days before the first dose of GM) and SAC (250 mg/Kg/i.p. 24 h before the first dose of GM and 125 mg/Kg/12 h/4 days along GM-treatment). Furthermore, AGE and SAC prevented the GM-induced oxidative stress (evaluated by the levels of protein carbonyl groups, nitrotyrosine, and 4-hydroxynonenal) and the decrease in manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), GPx, and glutathione reductase (GR) activities in renal cortex. In conclusion, the protective effect of AGE was associated with the decrease in the oxidative stress and the preservation of Mn-SOD, GPx, and GR activities in renal cortex, rather than by diminishing renal GM content, in GM and AGE-treated rats. SAC ameliorated the GM-induced ARF by a mechanism related, at least in part, to its ability to decrease oxidative stress and to preserve antioxidant enzyme activities in renal cortex. Furthermore, SAC protected against GM-induced nephrotoxicity without compromising its bactericide activity. These data suggest that AGE and SAC may be useful agents in the prevention of GM-nephrotoxicity.



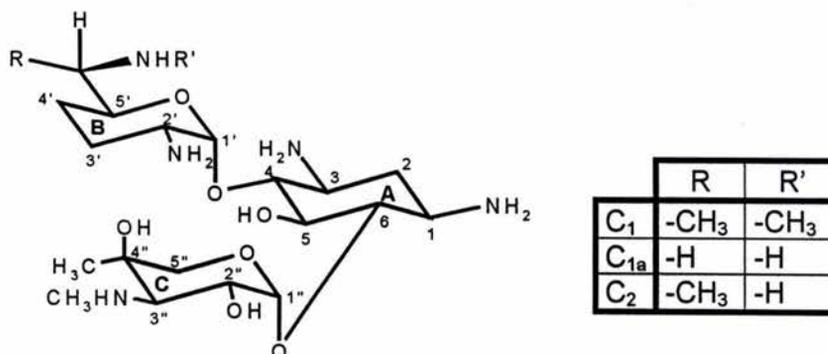
III. INTRODUCCIÓN

1. GENTAMICINA

La gentamicina (GM) es un antibiótico empleado en el tratamiento de algunas infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia sp.*, *Citrobacter sp.*, *Providencia sp.*, *Staphylococcus sp.* (coagulasa positiva y coagulasa negativa, incluyendo cepas resistentes a penicilina y metilcilina) y *Neisseria gonorrhoeae*. Sin embargo, induce efectos tóxicos sobre riñón, oído y sistema nervioso central, de los cuales el efecto nefrotóxico representa un problema clínico serio. Aunque existen nuevos agentes, menos tóxicos, como las cefalosporinas de tercera generación, la GM se sigue utilizando en los hospitales debido a que tiene varias ventajas: 1) casi no genera resistencia entre bacterias de la familia Enterobacteriaceae y *P. aeruginosa* (Edson & Terrell, 1999), 2) su bajo costo, 3) su rápida acción bactericida, 4) su amplio espectro de actividad especialmente contra bacterias Gram negativas y 5) su estabilidad química. Así mismo, se conoce muy bien su farmacología, toxicidad y propiedades terapéuticas (Ali, 1995). Por lo tanto, el valor de la GM en la práctica clínica aumentaría si se encontrara la manera de proteger al riñón de los efectos colaterales.

1.1 Estructura química

La GM es un antibiótico que pertenece a los aminoglucósidos, los cuales estructuralmente se pueden considerar como oligosacáridos, aunque el componente característico de su molécula es el aminociclitol (anillo A) y no un azúcar. El aminociclitol está unido a través de dos enlaces glucosídicos a dos aminoazúcares (anillos B y C) (Esquema 1).



Esquema 1. Fórmula estructural de la gentamicina (GM). Tomada de Laurent & Tulkens, 1987.



La GM es un complejo de por lo menos tres antibióticos relacionados estructuralmente, denominados C₁ (40%), C_{1a} (20%) y C₂ (40%). Todos son producto de la fermentación de *Micromonospora purpurea*. La diferencia entre estos tres componentes reside en la presencia y en el número de grupos metilo, ligados al carbono 6'. Esquema 1 (Calderón, 1996).

La acción bactericida de la GM involucra su unión a la subunidad 30S del ribosoma (interactuando en una zona que contiene las proteínas S3, S4, S5 y S12), aunque también puede unirse a la proteína L6 de la subunidad 50S, causando cambios en la forma de éste e interrumpiendo los pasos iniciales de la síntesis de proteínas (Kacew & Bergeron, 1990).

1.2 Farmacocinética

La GM es una molécula policatiónica a pH fisiológico, altamente polar, que no se absorbe en el tracto gastrointestinal, pero que se absorbe rápidamente después de una inyección subcutánea o intramuscular. Su vida media en el plasma sanguíneo es de 2-3 h en el humano y de 30 min en los animales pequeños de laboratorio (Laurent & Tulkens, 1987). La unión de la GM a las proteínas plasmáticas es mínima. No se conocen metabolitos de la GM y se excreta por filtración glomerular, eliminándose en la orina; sin embargo, una pequeña parte (3-5%) se reabsorbe y se transporta al interior de las células del túbulo proximal (Bennett, 1989; Laurent & Tulkens, 1987). Consecuentemente, los niveles de la GM en tejidos son bajos, excepto en la corteza renal, donde su vida media es mayor a 100 h (Laurent & Tulkens, 1987).

1.3 Mecanismo de entrada a las células tubulares

El transporte de los aminoglicósidos en el riñón se ha estudiado por técnicas *in vivo* (Josepovitz *et al.*, 1982) e *in vitro* (Sastrasinh *et al.*, 1982), proponiéndose 2 vías principales por las que la GM y en general los aminoglicósidos, se acumulan en la corteza renal.

Una de estas vías propone que la GM es transportada al interior de las células tubulares por pinocitosis, a través de un mecanismo análogo a la reabsorción de las proteínas en este segmento de la nefrona (Silverblatt & Kuehn, 1979). Aunque las macromoléculas son transportadas usualmente por pinocitosis, las moléculas de bajo peso molecular como la GM también pueden ser transportadas por un mecanismo similar a la pinocitosis. La GM puede unirse por atracciones electrostáticas con los fosfolípidos de la membrana de las células



tubulares, debido a que es una molécula policationica a pH fisiológico (Esquema 1) (Sastrasinh *et al.*, 1982). La entrada de la GM se inicia cuando ésta se une a las invaginaciones de la superficie membranal de las células en borde de cepillo. Esta invaginación forma vesículas pinocíticas apicales, que posteriormente crecen para formar vacuolas mayores que son transportadas a la parte media y basal de la célula, donde se fusionan con los lisosomas primarios. La GM se acumula en los lisosomas secundarios (Silverblatt & Kuehn, 1979).

La otra propuesta se basa en que debido a que los fosfolípidos se distribuyen en la membrana celular de muchos tejidos y a que la GM se acumula solo en ciertos tipos celulares como las células del túbulo proximal, entonces debe existir un factor que esté involucrado en la acumulación de la GM en estos tipos de células (Nagai *et al.*, 2001). Se ha postulado que una vía podría involucrar a la megalina, que es una glicoproteína de 600 KDa, que funciona como receptor endocítico y que se expresa en epitelio del túbulo proximal renal, en epitelio del oído, en epitelio retinal y en neumocitos tipo II (Zheng *et al.*, 1994). Los ligandos fisiológicos de ésta proteína incluyen a la insulina (Orlando *et al.*, 1998), acarreadores de vitaminas lipofílicas y la proteína de unión a la vitamina D (Nykjaer *et al.*, 1999), la proteína de unión al retinol (Christensen *et al.*, 1999), el Ca^{2+} (Christensen *et al.*, 1992), entre otros. Así mismo, se ha visto que la megalina podría estar involucrada en la unión y endocitosis de drogas polibásicas como los aminoglicósidos, incluida la GM, en las células renales con borde en cepillo tanto *in vitro* (Moestrup *et al.*, 1995) como *in vivo* (Nagai *et al.*, 2001), ya que en ratones que carecen de megalina, la GM se elimina completamente (Schmitz *et al.*, 2002). También, el uso de antagonistas disminuye la acumulación de GM (Moestrup *et al.*, 1995) y otros aminoglicósidos (Nagai *et al.*, 2001) en las células renales. Por lo tanto, estos estudios indican que la megalina es una proteína que podría estar involucrada en la acumulación de la GM y otros aminoglicósidos en la corteza renal.

1.4 Patología

Una vez que la GM entra en las células del túbulo proximal, se acumula en los lisosomas secundarios donde inactiva enzimas como la fosfolipasa A₁, la fosfolipasa C y la esfingomielinasa (Laurent *et al.*, 1990), causando aumento en los fosfolípidos e interfiriendo con la función normal de los lisosomas; sin embargo, el mecanismo por el cual lo hace aún se



desconoce. Esta alteración podría ser el primer paso de una serie de eventos que contribuyan a la necrosis tubular (Silverblatt & Kuehn, 1979).

Algunos autores creen que la acumulación de la GM en los lisosomas del túbulo proximal puede explicar la nefrotoxicidad inducida por este antibiótico. En este contexto, aunque es claro que la reabsorción de GM en el túbulo proximal es indispensable para que ejerza nefrotoxicidad, la concentración de GM en los túbulos no necesariamente correlaciona con la nefrotoxicidad, ya que se ha encontrado que la alimentación con una dieta de polvo de ajo al 2% (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000) y el tratamiento con: superóxido dismutasa, dimetiltiourea y ácido poliaspártico (Nakajima *et al.*, 1994; Ramsammy *et al.*, 1989) protegen contra la nefrotoxicidad por GM sin afectar el contenido de ésta en la corteza renal. Por otro lado, se ha encontrado que la administración de piridoxal-5-fosfato reduce un 40% los niveles de GM en riñón, pero no se reduce la nefrotoxicidad (Kacew, 1989).

1.5 Toxicidad

La administración de la GM puede llevar a la manifestación de algunos efectos colaterales como neurotoxicidad, ototoxicidad y nefrotoxicidad.

Actualmente la incidencia de efectos *neurotóxicos* es muy baja debido al ajuste en la dosis del antibiótico y en la duración del tratamiento.

La *ototoxicidad* ocurre como resultado del daño al oído medio, aún se encuentra en un 3-5% de los pacientes tratados con aminoglucósidos y usualmente es irreversible (Laurent & Tulkens, 1987). Los agentes ototóxicos, incluidos los aminoglicósidos, inducen la pérdida del oído medio debido a que alteran la función del caracol (Clerici *et al.*, 1996). Aunque el daño estructural inducido por estos agentes en el caracol está bien documentado, poco se sabe del mecanismo de acción de estos agentes dentro de éste (Clerici *et al.*, 1996). Recientemente, el mecanismo de daño inducido por los xenobióticos en otros órganos se ha relacionado con la alteración en el metabolismo del calcio intracelular (Nicotera *et al.*, 1992) y con la generación de radicales libres. En el caso de la GM, se ha propuesto que la inducción de la ototoxicidad se debe a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Lautermann *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1997; Song & Schacht, 1996), ya que se ha encontrado que la



administración de hierro exacerba la ototoxicidad inducida por la GM (Conlon & Smith, 1998) y que el tratamiento con antioxidantes como el glutatión (Lautermann *et al.*, 1995) o con quelantes de hierro (Song *et al.*, 1997) reducen la ototoxicidad inducida por este antibiótico. Esta propuesta también es apoyada por algunos autores que postulan que los efectos ototóxicos inducidos por este antibiótico requieren de una forma "activada" del mismo (Huang & Schacht, 1990). Esta activación procedería de la formación de un complejo redox entre la GM y el hierro, el cual es un potente catalizador para la generación de radicales libres de oxígeno (Priuska & Schacht, 1995).

La **nefrotoxicidad** es el efecto colateral más frecuentemente asociado a la administración de GM, ya que se ha estimado que el 10-20% de los pacientes tratados con este antibiótico por más de 7 días muestran signos de daño renal (Lerner *et al.*, 1986). La GM ejerce diferentes efectos en múltiples sitios de la nefrona (Weinberg *et al.*, 1985), las principales alteraciones bioquímicas y funcionales inducidas por la GM se presentan en la tabla I.

Tabla I. Alteraciones bioquímicas y funcionales asociadas con el uso de GM

1. Disminución de la velocidad de filtración glomerular.
 2. Disminución de la reabsorción en el túbulo proximal, incremento en la excreción urinaria de proteínas y de algunas enzimas como la N-acetil- β -D-glucosaminidasa, deterioro en el manejo de los electrolitos y alteración de la capacidad para concentrar la orina.
 3. Fosfolipidosis renal y un aumento en la excreción urinaria de los fosfolípidos.
 4. Alteraciones en mitocondrias renales corticales. Disminución en el transporte de electrones de la cadena respiratoria y en la síntesis de ATP.
 5. Inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+
-

(Bennett, 1989; Kaloyanides, 1984; Tulkens, 1989)

Histológicamente, el túbulo proximal es el sitio primario de daño por GM (Nakajima *et al.*, 1994). Los signos clínicos característicos de la nefrotoxicidad inducida por la GM son: aumento de la urea en el plasma sanguíneo y la creatinina sérica como resultado de la disminución en la velocidad de filtración glomerular (GFR). En las ratas se pueden reproducir alteraciones funcionales similares a las encontradas en humanos, cuando las ratas se tratan con dosis altas de GM (Schor *et al.*, 1981); sin embargo, en ratas el deterioro de la función renal es reversible cuando se suspende la administración del antibiótico (Laurent & Tulkens, 1987) a diferencia del daño al oído medio, el cual una vez establecido es irreversible.



1.6 Mecanismo de inducción de la nefrotoxicidad

En el modelo de insuficiencia renal inducida por la GM, no hay un consenso en la literatura con relación al mecanismo de acción de la GM o con relación a los factores que modulan la nefrotoxicidad por este antibiótico (Appel, 1990; Kacew & Bergeron, 1990). Sin embargo, en algunos modelos experimentales se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ERO's) como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH) desempeñan un papel esencial en el mecanismo de generación de varias enfermedades renales como la isquemia-reperfusión (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1992) o la insuficiencia renal aguda, incluida la inducida por GM (Guidet & Shah, 1989; Sha & Schacht, 1999; Shah & Walker, 1992; Walker *et al.*, 1999; Walker & Shah, 1988; 1987; Yang *et al.*, 1995), entre otros.

Al igual que en estos modelos, existe evidencia que sugiere la participación de las ERO's en la nefrotoxicidad inducida por la GM. Dentro de estas evidencias se pueden mencionar las siguientes:

➤ **Evidencias *in vitro***

1. La GM aumenta la generación de O_2^- , H_2O_2 y OH en la mitocondria renal (Walker & Shah, 1987; Yang *et al.*, 1995).
2. La GM aumenta la liberación del hierro de la mitocondria renal cortical (Ueda *et al.*, 1993).
3. La formación de complejos hierro-GM causa lipoperoxidación (LPx) y es un potente catalizador para la formación de radicales libres (Priuska & Schacht, 1995).

➤ **Evidencias *in vivo***

1. Hay un aumento en la producción de H_2O_2 en la corteza renal de las ratas tratadas con GM (Guidet & Shah, 1989).
2. Uno de los eventos que acompaña el desarrollo de la nefrotoxicidad en la corteza renal es el aumento de la LPx (Ali, 2002; Al-Majed *et al.*, 2002; Ateşşahin *et al.*, 2003; Cuzzocrea *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2000; Naidu *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 1994; Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000).
3. Se ha observado un incremento en el contenido de nitrotirosina (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Mazzon *et al.*, 2001; Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2003a; b) y de grupos carbonilo en las proteínas (Sener *et al.*, 2002).



4. El tratamiento con GM induce una disminución en el contenido de antioxidantes como el glutatión (Ali, 2002; Ateşşahin *et al.*, 2003; Sener *et al.*, 2002).
5. La administración de Fe en la dieta o por vía intramuscular aumenta la nefrotoxicidad inducida por GM (Ben-Ismael *et al.*, 1994; Kays *et al.*, 1992).
6. La administración de antioxidantes como la dimetiltiourea y el dimetilsufóxido (Nakajima *et al.*, 1994; Walker & Shah, 1988), el ácido lipóico (Varalakshmi *et al.*, 2003), el benzoato de sodio y la deferoxamina (Walker & Shah, 1988), la superóxido dismutasa (Ali & Bashir, 1996; Nakajima *et al.*, 1994), una superóxido dismutasa mimética (Cuzzocrea *et al.*, 2002), la vitamina E y el selenio (Abdel-Naim *et al.*, 1999; Ademuyiwa *et al.*, 1990), el probucol (Abdel-Naim *et al.*, 1999), el carvedilol (Kumar *et al.*, 2000), la N-acetilcisteína (Mazzon *et al.*, 2001), la melatonina (Sener *et al.*, 2002), la taurina (Erdem *et al.*, 2000), un extracto de ginkgo biloba (Naidu *et al.*, 2000), la planta medicinal *Rhazya stricta decne* (Ali, 2002), la goma arábiga (Al-Majed *et al.*, 2002), el cloruro de manganeso (Ateşşahin *et al.*, 2003), el resveratrol (Morales *et al.*, 2002), el polvo de ajo (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2000) y algunos compuestos del ajo como el dialisulfuro o el dialildisulfuro (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2003a; b), disminuyen el daño renal inducido por la GM.

A pesar de lo anterior, no se conoce el mecanismo exacto por medio del cual la GM aumenta la producción de las ERO's; así como tampoco, se ha establecido una asociación temporal entre las alteraciones bioquímicas producidas por la GM, como la fosfolipidosis y la producción de las ERO's.

2. EL RIÑÓN

El riñón es el encargado de remover del cuerpo varios 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 como: agua, glucosa, aminoácidos, proteínas y electrolitos (Na^+ , K^+ , HCO_3^- y Cl^-). Por consiguiente, el riñón es un órgano regulador que selectivamente excreta y/o retiene determinadas sustancias, preservando así la constancia del medio ambiente interno del organismo (Heinz, 1983).



2.1 Nefrona

La unidad funcional del riñón es la nefrona. Cada riñón humano contiene de 0.4×10^6 a 1.2×10^6 nefronas y cada riñón de rata contiene entre 30,000 y 34,000 nefronas aproximadamente (Nyengaard & Bendtsen, 1992). La nefrona está compuesta por el corpúsculo renal, que involucra el glomérulo invaginado en una estructura parecida a un saco denominada cápsula de Bowman, el túbulo proximal, el segmento delgado del asa de Henle, el túbulo distal y los túbulos colectores (Tisher & Madsen, 2000).

2.2 Células tubulares proximales

Las células epiteliales que constituyen el túbulo contorneado proximal tienen una forma compleja. Su superficie luminal posee dos características fundamentales: gran riqueza de microvellosidades (modificación de la membrana celular que forma el borde en cepillo observable con microscopía óptica) y un sistema de túbulos apicales. Las microvellosidades, incrementan la superficie luminal 40 veces, lo que aumenta la capacidad de reabsorción tubular (Welling & Welling, 1975). Es en esta sección de la nefrona, es 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 Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , etc. (Brenner, 2000; Heinz, 1983).

Los organelos citoplasmáticos más abundantes son las mitocondrias y diferentes tipos de cuerpos densos; estos últimos, son en su mayoría lisosomas primarios y secundarios, así como peroxisomas (Bergeron *et al.*, 1980; Ericsson & Trump, 1966). En la membrana plasmática de estas células se ha demostrado la presencia de ATPasa de Mg^{2+} , ATPasa de Na^+/K^+ , fosfatasa alcalina, aminopeptidasa y 5'-nucleotidasa (Heidrich *et al.*, 1972).

Una función importante del túbulo contorneado proximal y en menor grado de la parte recta, es la reabsorción y degradación de diversas macromoléculas incluyendo albúmina y proteínas plasmáticas de bajo peso molecular del filtrado glomerular. Además, se ha comprobado que la absorción de proteínas por el túbulo proximal es un proceso selectivo determinado por la carga neta de la proteína y, posiblemente, por la existencia de sitios de endocitosis preferentes para ciertas proteínas (Christensen *et al.*, 1983).



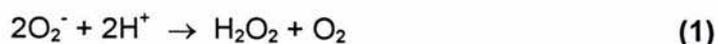
3. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Por el potencial efecto destructivo de las ERO's, la célula cuenta con defensas para evitar el daño oxidativo (Yu, 1994). Estos sistemas de detoxificación involucran enzimas y/o atrapadores no enzimáticos de ERO's presentes en las células (Krinsky, 1992; Stocker *et al.*, 1987; Yu, 1994). Dentro de los atrapadores de ERO's no enzimáticos podemos mencionar a las vitaminas E y C, a la bilirrubina, al glutatión, al ácido úrico, entre otros (Krinsky, 1992). Mientras que las principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Yu, 1994), aunque existen otras como las peroxiredoxinas (Prx), que son una familia de peroxidases recientemente descubiertas y que están altamente conservadas en eucariontes y en procariontes. Las Prx reducen hidroperóxidos con tioredoxina u otro intermediario que contenga un grupo tiol como donador de electrones (Choi *et al.*, 1998). La hemo oxigenasa (HO), se considera una enzima antioxidante, porque cataliza la degradación del grupo hemo (un pro-oxidante) para formar biliverdina (antioxidante), hierro y monóxido de carbono. Posteriormente, la biliverdina es transformada a bilirrubina (antioxidante) por la biliverdin reductasa (Dennery, 2000), entre otras.

3.1 Superóxido dismutasa (Óxido reductasa EC 1.15.1.1)

Los mamíferos poseen tres isomorfos: la dependiente de manganeso (Mn-SOD), la dependiente de cobre y de zinc (CuZn-SOD) y la extracelular.

Las tres isomorfos se sintetizan en los ribosomas citoplásmicos, todas producto de genes nucleares diferentes (Ho *et al.*, 1991) y catalizan la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno (reacción 1).



La SOD no es realmente una enzima destoxicante ya que el producto de su actividad, el H_2O_2 , es un agente tóxico. Sin embargo, la dismutación del anión superóxido es el primer paso de una cascada enzimática que conduce a su inactivación completa. El H_2O_2 generado es metabolizado por la CAT y la GPx.



INTRODUCCIÓN

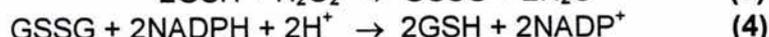
3.2 Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

Es una hemoproteína tetramérica de 240 kDa. Se localiza principalmente en peroxisomas y cataliza la siguiente reacción (2):



3.3 Glutión peroxidasa (GPx)

Esta enzima también confiere protección a la célula ante un exceso de H_2O_2 . Cataliza la oxidación del glutión (GSH) a disulfuro glutión (GSSG) (reacción 3), el cual es reducido por la enzima glutión reductasa en presencia del NADPH (reacción 4). La forma activa de GPx contiene selenio.



Si se altera el balance entre la formación de ERO's y los mecanismos antioxidantes por incremento de los primeros o debilitamiento de los segundos, las ERO's inducen reacciones en cadena, que pueden dañar a las moléculas biológicas.

4. EL AJO

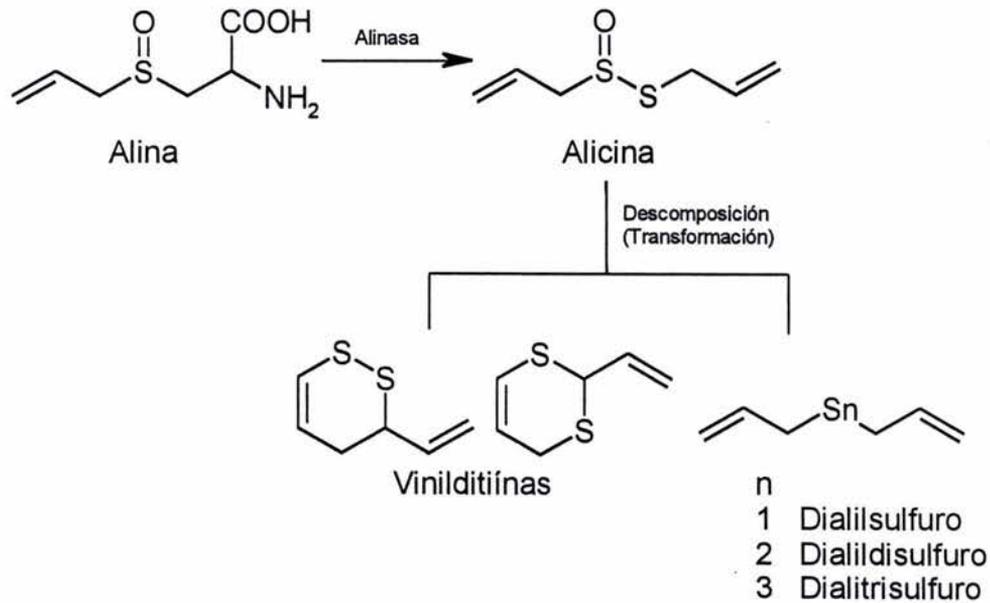
El ajo, [*Allium sativum* (Familia: Alliaceae)], se ha consumido como especie y medicina desde hace muchos años en todo el mundo, debido a que posee propiedades como: antimicrobiano, antimicótico, antineoplásico, antihipertensivo, inmunosupresor, hipoglicémico, hipolipémico y antioxidante, entre otras (Sato & Miyata, 2000). Hasta la fecha existen numerosas publicaciones que gradualmente han ido confirmado los efectos benéficos que tradicionalmente se reconocían del ajo y actualmente se sabe, que muchos de estos efectos son debidos a los compuestos que están presentes en las diferentes preparaciones del ajo, ya que se sabe que el ajo es rico en compuestos sulfurados y es uno de los vegetales que contiene niveles elevados de selenio (3.5 mg/g de peso fresco) (Block *et al.*, 1996).

Los dientes de ajo, contienen compuestos sulfurados (2.3% de su peso seco) como: (+)-S-alil-L-cisteína sulfóxido (alina, ~1%), (+)-S-metil-L-cisteín sulfóxido (metina), (+)-S-(trans-1-propenil)-L-cisteínsulfóxido, S-(2-carboxipropil) glutión, γ -glutamil-S-alil-L-cisteína, γ -glutamil-S-(trans-1-propenil)-L-cisteína y γ -glutamil-S-alil-mercapto-L-cisteína (Lawson, 1998). Así, los



dientes de ajo almacenados a 4°C contienen ~0.9% de γ -glutamyl-S-cisteínas, ~1.8% de alina y pequeñas cantidades de S-alilcisteína, pero no contienen alil 2-propenotiosulfinato (alicina) (Amagase *et al.*, 2001).

El olor característico del ajo es debido a la alicina y a otros compuestos sulfurados solubles en aceite. Los dientes de ajo intactos contienen altas cantidades de γ -glutamylcisteínas, las cuales pueden ser oxidadas para dar alina. Cuando los dientes de ajo son cortados, la enzima alinasa actúa sobre la alina generando la alicina, compuesto de olor característico extremadamente inestable que se descompone espontáneamente a dialilsulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS) y dialtrisulfuro (DATS) incluyendo las vinilditiínas (Amagase *et al.*, 2001; Freeman & Koderá, 1995) y el ajoene (Block *et al.*, 1996). Estas transformaciones ocurren en un período corto (Esquema 2).



Esquema 2. Algunos cambios químicos en el ajo. Cuando el ajo se corta, la enzima vacuolar alinasa, rápidamente transforma a la alina citosólica en alicina, la cual se descompone instantáneamente a otros compuestos como el dialilsulfuro (DAS), el dialildisulfuro (DADS), el dialitrisulfuro (DATS), las vinilditiínas y el ajoene.

Existen estudios que indican que la biodisponibilidad de la alicina es pobre (Amagase *et al.*, 2001), ya que después de la ingesta de ajo crudo o de alicina pura, ésta no se detecta en la sangre o en la orina; por lo tanto, su posible uso terapéutico sería muy limitado debido a su gran inestabilidad, además de que no existen presentaciones comerciales disponibles que



contengan alicina. Estos hallazgos apoyan la idea de que es poco probable que la alicina contribuya a los efectos benéficos del ajo.

En la actualidad se han realizado estudios que apoyan las propiedades antioxidantes de diferentes preparaciones del ajo, como: el extracto envejecido (Borek, 2001; Dillon *et al.*, 2003; 2002; Ide & Lau, 1999a; Ide *et al.*, 1997; 1996; Kim *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 1994; Numagami *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1994), el extracto acuoso (Lewin & Popov, 1994), el polvo (Pedraza-Chaverri, 2000; Rietz *et al.*, 1993) o el aceite de ajo (Iqbal & Athar, 1998), entre otros. Dichas propiedades, se han atribuido a algunos de sus compuestos sulfurados, los cuales varían dependiendo de la presentación de que se trate (Tabla II).

Tabla II. Principales compuestos sulfurados presentes en los dientes de ajo, el extracto de ajo envejecido, el polvo de ajo y el aceite de ajo^{a,b}

Diente de ajo	
	(mg/g producto)
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	6.0-14.0
γ-glutamilcisteínas ^c	5.0-15.0
Compuestos derivados de la alina ^d	3.5-8.0
Extracto de ajo envejecido	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	0.2-0.4
γ-glutamilcisteínas ^c	0.2-0.5
γ-glutamil-S-alilcisteína	0.1-0.4
S-alilcisteína	0.5-0.7
S-alilmercaptocisteína	0.1-0.2
Compuestos derivados de la alina ^d	0.1-0.2
Polvo de ajo	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	10.0-17.0
γ-glutamilcisteínas ^c	12.0-35.0
Compuestos derivados de la alina ^d	4.0-11.0
Aceite de ajo	
<u>Destilación con vapor:</u>	
Dialildisulfuro	0.05-2.8
Dialiltrisulfuro	0.04-2.0
Alilmetiltrisulfuro	0.03-1.7
Compuestos derivados de la alina	0.2-11
<u>Macerado:</u>	
Vinilditiínas	0.1-4.7
Ajoene	0.02-1.1
Dialiltrisulfuro	0.02-0.45
Compuestos derivados de la alina ^d	0.4-6.0

^aTomada de Lawson, 1998.

^bLa *n* para cada producto fue de 7 a 15.

^cLos valores de las γ-glutamilcisteínas de todos los productos son la suma de los compuestos S-alil y S-*trans*-1-propenil.

^dLos compuestos derivados de alina incluyen: alicina y otros tiosulfonatos (después de la adición de agua), alilsulfuros, vinilditiínas, ajoene y S-alilmercaptocisteína.



4.1 Extracto de ajo envejecido (EAE)

El EAE es un producto que se vende comúnmente en Estados Unidos, Japón y algunas partes de Europa, como un suplemento alimenticio.

El EAE es manufacturado por Wakunaga of America de la siguiente manera: los dientes de ajo se remojan en una mezcla de extracción que contiene etanol 15-20%. La mezcla anterior se envejece durante 18-20 meses (extracción natural) a temperatura ambiente. Después, el extracto se separa y se concentra para su uso (Kasuga *et al.*, 2001; Amagase *et al.*, 2001). Durante el proceso de envejecimiento, el olor y los compuestos irritantes del ajo se transforman en compuestos más estables.

El EAE contiene principalmente constituyentes solubles en H₂O (Tabla III) y pequeñas cantidades de compuestos solubles en aceite (Weinberg *et al.*, 1993).

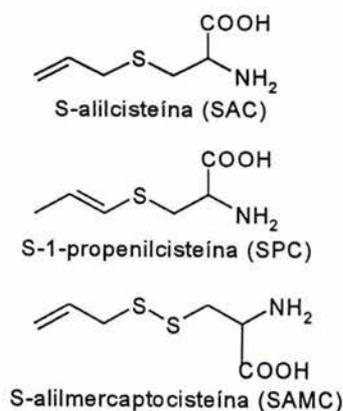
Tabla III. Composición química del extracto de ajo envejecido (EAE)^{a,b}

Alina	0.32±0.13
Cicloalina	0.34±0.08
γ-glutamyl-S-alilcisteína	0.25±0.12
γ-glutamyl-S-1-propenilcisteína	0.09±0.07
S-alilcisteína (SAC)	0.62±0.07
S-1-propenilcisteína (SPC)	0.37±0.04
S-alilmercaptocisteína (SAMC)	0.14±0.03
Cistina	0.01±0.01
Ácido glutámico	1.2±0.2
Arginina	2.2±1.1

^aTomado de Lawson, 1996.

^bLos datos se expresan como media±desviación estándar (mg/g producto) de 6 lotes.

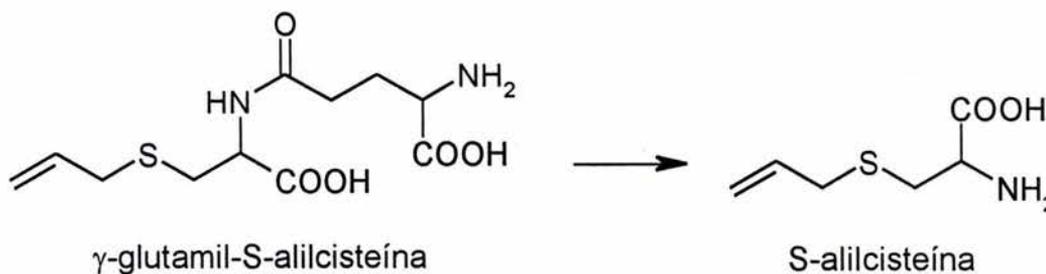
El EAE se caracteriza por contener altos niveles de S-alilcisteína (SAC), S-1-propenilcisteína (SPC) y S-alilmercaptocisteína (SAMC) (Esquema 3).



Esquema 3. Principales componentes en el extracto de ajo envejecido (EAE).



La SAC que se forma del catabolismo de la γ -glutamilsisteína (Esquema 4) y es uno de los compuestos organosulfurados solubles en agua; es estable e inodoro y su concentración en el EAE incrementa durante la extracción y el envejecimiento. La farmacocinética de la SAC está bien establecida, ya que se detecta en la sangre, el hígado y el riñón después de su ingesta oral. La biodisponibilidad de la SAC es de 100% en ratones, 98.2 en ratas y 87.2% en perros. La N-acetil-SAC se ha identificado con un metabolito de SAC, sugiriendo que la SAC podría ser transformada por la N-acetil transferasa (Nagae *et al.*, 1994).



Esquema 4. Las γ -glutamilsisteínas son convertidas en S-alicisteína (SAC) a través de una vía diferente de la vía alina/alicina.

Muchos trabajos se han desarrollado sobre la toxicidad del EAE, indicando que no tiene efectos adversos (Nakagawa *et al.*, 1984; Yoshida *et al.*, 1984). La SAC es un compuesto que se ha estudiado mucho por sus efectos farmacológicos y se ha demostrado que la toxicidad de la SAC frente a otros compuestos típicos del ajo como la alicina y el DADS es 30 veces menor (Amagase *et al.*, 2001). El 50% de la dosis letal oral para alicina en ratones es (mg/Kg peso): machos 309, hembras 363; para DADS: machos 145, hembras 1303 y para SAC: machos 8890, hembras 9390.

Muchos de los estudios que se han realizado con el EAE evalúan su efecto como antioxidante y se ha encontrado que posee las siguientes propiedades: 1) atrapa ERO's (Ide *et al.*, 1996); 2) inhibe la formación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico producidas por el t-butilhidroperóxido en fracciones microsomales de hígado (Imai *et al.*, 1994); 3) disminuye la producción de H_2O_2 en células endoteliales, cuando éstas son expuestas a un sistema generador de O_2^- y 4) en células endoteliales normales disminuye la producción de H_2O_2 y aumenta los niveles de SOD, CAT y GPx; lo cual podría explicar la disminución del H_2O_2 (Geng & Lau, 1997; Wei & Lau, 1998).



Por otro lado, se ha encontrado que sus dos principales constituyentes, la SAC y la SAMC, también poseen propiedades antioxidantes (Geng *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2001; Ide & Lau, 2001; 1999b; 1997; Ide *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 1994; Mostafa *et al.*, 2000; Numagami & Ohnishi, 2001; Numagami *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1994), ya que se ha encontrado que: 1) atrapan ERO's (Imai *et al.*, 1994); 2) inhiben la LPx (Ide & Lau, 1997; Ide *et al.*, 1997; 1996); 3) atrapan H₂O₂ (Augusti & Sheela, 1996; Ide *et al.*, 1996) y 4) inhiben la oxidación de las lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL), lo que puede proteger a las células endoteliales vasculares del daño causado por las LDL oxidadas (Ide & Lau, 1997; Ide *et al.*, 1997). Además, la SAC incrementa la actividad de la CAT y la SOD en el hígado de ratas diabéticas *in vivo* (Augusti & Sheela, 1996) e inhibe de manera dosis dependiente la activación del factor NF- κ B inducida por el factor de necrosis tumoral α y el H₂O₂ (Geng *et al.*, 1997).

5. ESTUDIOS EN CÉLULAS LLC-PK₁

Los estudios en líneas celulares son de gran importancia ya que permiten la evaluación de algunos factores o mecanismos que en animales de laboratorio sería muy complicada. Por ello, el uso de la línea celular LLC-PK₁, que es una línea de células epiteliales de riñón de cerdo, se ha caracterizado bien como un modelo para el análisis de algunas funciones epiteliales de las células de los túbulos proximales. El uso de esta línea celular para estudiar el efecto de compuestos xenobióticos que son nefrotóxicos se debe a las siguientes razones: 1) los efectos nefrotóxicos observados resultan de una población celular homogénea, 2) poseen características de células de túbulo proximal, ya que exhiben transporte unilateral de sales y agua, resultando en la formación de un domo y poseen alta actividad de marcadores enzimáticos de túbulo proximal; así mismo se ha demostrado que poseen sistemas de transporte de hexosas, aminoácidos, fosfatos y de iones orgánicos similares a los observados en las células tubulares, 3) son susceptibles al daño inducido por fármacos (nefrotóxicos), 4) la sustancia que desea estudiarse es el único parámetro experimental que se varía, 5) no hay influencia de sistemas reguladores como en los sistemas animales y 6) el daño celular puede ser fácilmente determinado (Saito *et al.*, 1986; Steinmassl *et al.*, 1995).



IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La gentamicina (GM) es un antibiótico aminoglicósido muy usado en la práctica clínica, debido a: 1) que es de amplio espectro bactericida, especialmente contra bacterias Gram negativas, 2) que es efectivo contra microorganismos resistentes a antibióticos β -lactámicos, 3) su bajo costo y 4) los bajos niveles de resistencia que induce entre bacterias de la familia enterobacteriaceae. Sin embargo, la insuficiencia renal aguda (IRA) es la mayor complicación del tratamiento con GM, lo cual limita su uso, además de que complica y encarece el tratamiento de los pacientes que reciben este antibiótico. Se ha estimado que la nefrototoxicidad, ocurre en un 10-20% de los pacientes que son tratados con GM, lo que ha motivado la búsqueda de prácticas seguras y efectivas que puedan disminuir la IRA inducida por la GM e incrementar de esta manera el valor clínico de este antibiótico.

Aunque el mecanismo exacto por el cual se induce el daño renal no está claro, se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno (ERO's) están involucradas; ya que se ha encontrado un incremento en la lipoperoxidación y en el contenido de nitrotirosina y de grupos carbonilo en las proteínas, así como una disminución en el contenido de glutatión. Además, la hipótesis de un mecanismo que involucre la producción de ERO's, está apoyada por el hecho de que la administración de antioxidantes disminuyen la severidad de la IRA inducida por la GM.

En un trabajo previo de este laboratorio, se encontró que la IRA inducida por la GM, disminuye parcialmente en las ratas alimentadas con una dieta enriquecida con polvo de ajo al 2%. Sin embargo, el polvo de ajo es una presentación poco práctica para emplearla con fines profilácticos o terapéuticos en humanos debido a que una persona (de 70 Kg), debería consumir 78.5 g de polvo de ajo al día, equivalente a lo que consumieron las ratas en ese estudio, para reproducir las mismas condiciones experimentales que en ese trabajo; lo cual, clínicamente no sería práctico. Además, en ese trabajo, las ratas se alimentaron con polvo de ajo durante 14 días antes del tratamiento con GM. Por otro lado, el olor característico del ajo, debido a sus compuestos organosulfurados, podría ser una limitante para su empleo generalizado en humanos.

Por otra parte, si pensamos en el aislamiento de alguno de los compuestos que están presentes en el polvo de ajo y que quizá puedan ser los responsables del efecto parcialmente protector, nos encontramos con que estos candidatos podrían ser la alina y la alicina; sin embargo, ambos compuestos presentan algunas desventajas. La alina al estar en medio



acuoso se transforma por efecto de la alinasa en alicina, la cual es un compuesto inestable que sufre descomposición espontánea y rápida a los derivados mono-, di- y dialiltrisulfuro incluyendo las vinilditiinas y el ajoene. Además, está bien documentado que la biodisponibilidad de la alicina es baja, ya que después de la ingesta de ajo crudo o de alicina pura, ésta no se detecta en la sangre o en la orina. También se sabe que no existen presentaciones comerciales disponibles que contengan alicina y, además, ambos compuestos (alicina y alina) son caros, razones por las cuales su posible uso terapéutico también estaría limitado.

Debido a esto, decidimos buscar una presentación del ajo que no presentará estas limitantes y que mostrará actividad antioxidante. Así, encontramos al extracto de ajo envejecido (EAE), una presentación en la que los compuestos olorosos se han convertido en compuestos más estables y con menos olor, además de que es un buen antioxidante. Por ello, en este trabajo se propone evaluar el efecto del EAE y uno de sus principales compuestos, la S-alilcisteína (SAC), sobre el daño renal inducido por la GM.

La SAC se propone debido a que es un buen antioxidante y al ser el compuesto más abundante del EAE, podría el candidato con mejor aplicación futura en la prevención de la IRA inducida por la GM, debido a que: 1) su biodisponibilidad es alta, 98.2 % en ratas (Nagae *et al.*, 1994), 2) es estable (Lawson, 1996), 3) su volatilidad es baja, 4) es soluble en agua (Kodera *et al.*, 2002), 5) es menos tóxico que otros compuestos del ajo (Amagase *et al.*, 2001) y 6) su síntesis química es sencilla (Lawson *et al.*, 1991), a diferencia de otros compuestos que también poseen propiedades antioxidantes.



V. HIPÓTESIS

Debido a que existen evidencias del incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) en la nefrotoxicidad inducida por la GM y a que el tratamiento con antioxidantes, disminuye el daño renal inducido por la GM, es posible que:

1. El extracto de ajo envejecido (EAE), una presentación comercialmente disponible del ajo, y uno de sus componentes mayoritarios, la S-alicisteína (SAC), muestren un efecto similar o mayor al observado con el polvo de ajo sobre la nefrotoxicidad inducida por la GM, debido a un efecto antioxidante directo y/o mediante la modificación en la actividad y/o la expresión de las enzimas antioxidantes.
2. La alina y la alicina (dos compuestos sulfurados presentes en el polvo de ajo), muestren un efecto citoprotector sobre la muerte celular inducida por la GM.



VI. OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto del EAE y la SAC sobre la nefrotoxicidad inducida por la GM y determinar si este efecto está relacionado con la prevención del estrés oxidativo renal y/o con la alteración en la expresión renal de las enzimas antioxidantes Mn-SOD, CuZn-SOD, CAT, GPx y GR.
2. Evaluar el efecto de la SAC sobre la capacidad bactericida de la GM.
3. Evaluar el efecto de la alina y la alicina sobre la muerte celular inducida por la GM *in vitro*.



VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

El extracto de ajo envejecido (EAE) en su presentación comercial de Kyolic® Liquid y la S-alicisteína estándar (SAC-St) fueron donados por Wakunaga of America, Co., Ltd (Misión Viejo, CA). La alicina y la alina se adquirieron de LKT Laboratories (St. Paul, MN). El polvo de ajo se adquirió de McCormick® (México D.F.). La gentamicina (GM) se adquirió de Schering-Plough, (México, D.F.) en su presentación comercial Garamicina®, solución inyectable de 160 mg/2mL.

El p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminido, la xantina oxidasa, la xantina, el ácido ascórbico, el ácido tiobarbitúrico (TBA), la deferoxamina (DFO), el tetrametoxipropano, la desoxiribosa, el nitroazul de tetrazolio (NBT), la albúmina sérica bovina (albúmina), la guanidina, el dietilditiocarbamato (DDC), la superóxido dismutasa (CuZn-SOD) de eritrocitos bovinos, la leupeptina, la pepstatina, la aprotinina, la acrilamida, la bisacrilamida, la glicina, el Tris-HCl, el persulfato de amonio, el glicerol, el dodecilsulfato de sodio (SDS), el ditioneitol (DTT), la tetrametiletilendiamina (TEMED), el xilol, la nicotidamida adenina dinucleótido, reducida (NADH), la nicotidamida adenina dinucleótido fosfato, reducida (NADPH), el azul de Coomassie, el azul de bromofenol, el fenilisotiocianato (PITC), el sulfato de estreptomycin, la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), el glutaraldehído, el cloruro de L-cisteína monohidratada, el bromuro de alilo, la trietilamina, el fenilisotiocianato, la fenasina metosulfato (PMS), el naranja de xilenol, el butiraldehído tolueno, el dimetil sulfóxido (DMSO), el p-nitrofenol, el glutatión reducido (GSH), el glutatión oxidado (GSSG), la glutatión reductasa (GR), el ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), la tripsina, el Tritón X-100, el ácido N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico);4-(2-hidroxi-etil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), la N-acetilcisteína (NAC), la hematoxilina, la eosina y la diaminibencidina (DAB) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

El suero fetal bovino (SFB) y el medio de cultivo (DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium) con rojo de fenol se adquirieron de Gibco (México, D.F.).

Los anticuerpos policlonales anti-Mn-SOD y anti-CuZn-SOD usados en el western blot, se adquirieron de Stressgen Biotechnologies Corp. (Victoria, BC, Canadá). El anticuerpo anti-catalasa de humano se adquirió de Calbiochem (San Diego, CA). El anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina se adquirió de Upstate (Lake Placid, VA). El anticuerpo policlonal anti-4-



MATERIAL Y MÉTODOS

hidroxinonenal se adquirió de Oxis International, Inc. (Portland, OR). Los anticuerpos secundarios dirigidos contra IgG de conejo y de ratón se adquirieron de Amersham, Life Science (Buckinghamshire, England).

Para las determinaciones del nitrógeno de urea y creatinina se usaron los estuches de Spinreact (Girona, España). Para determinar el contenido de la GM se empleó un estuche de Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) y para el western blot se usó un estuche de quimioluminiscencia de Amersham, Life Science (Buckinghamshire, England).

Las sales de fosfatos para los amortiguadores, el ácido tricloroacético (TCA), el citrato de sodio, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el carbonato de sodio (Na_2CO_3), el cloruro cúprico (CuCl_2), el sulfato de amonio, el cloruro de sodio (NaCl), el sulfato ferroso amoniacal, el persulfato de potasio, el ácido sulfúrico (H_2SO_4), el ácido clorhídrico (HCl), el isopropanol, el acetato de etilo, el acetonitrilo, el formaldehído, el etanol absoluto (EtOH) y el ácido acético glacial de grado analítico se adquirieron de J.T. Baker (México, D.F.).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el metanol grado HPLC se adquirieron de Mallinckrodt (México, D.F.). La azida de sodio se adquirió de Merck. El cloruro férrico (FeCl_3) se adquirió de Aldrich.

2. ESTUDIOS *in vivo*

2.1 Diseño experimental con extracto de ajo envejecido (EAE)

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 240-280 g de peso, divididas en 4 grupos: 1) Control (CT), tratado con solución salina; 2) Gentamicina (GM), tratado con GM; 3) Extracto de ajo envejecido (EAE), tratado con EAE y 4) Gentamicina + Extracto de ajo envejecido (GM+EAE), tratado con GM y el EAE.

La GM se administró subcutáneamente cada 12 h durante 4 días en una dosis de 70 mg/Kg de peso.

El EAE se administró en una dosis de 1.2 mL/Kg de peso, intraperitonealmente cada 24 h durante 6 días (dos días antes de la administración de GM y durante los 4 días en que se administró este antibiótico).



2.2 Diseño experimental con diferentes dosis de S-alilcisteína (SAC)

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 240-280 g de peso, divididas en 4 grupos: 1) Control (CT), tratado con solución salina; 2) Gentamicina (GM), tratado con GM; 3) S-alilcisteína (SAC), tratado con SAC y 4) Gentamicina + S-alilcisteína (GM+SAC), tratado con GM y SAC.

La GM se administró subcutáneamente cada 12 h durante 4 días en una dosis de 70 mg/Kg de peso.

Los animales recibieron intraperitonealmente una dosis de 25, 37.5, 75, 100 y 125 mg de SAC/Kg de peso, 24 h antes de iniciar el tratamiento con GM y cada 12 h durante los 4 días de tratamiento con este antibiótico.

2.3 Diseño experimental con SAC

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 230-280 g de peso, divididas en 4 grupos: 1) Control (CT), tratado con solución salina; 2) Gentamicina (GM), tratado con GM; 3) S-alilcisteína (SAC), tratado con SAC y 4) Gentamicina + S-alilcisteína (GM+SAC), tratado con GM y SAC.

La GM se administró subcutáneamente cada 12 h durante 4 días en una dosis de 70 mg/Kg de peso.

Los animales recibieron intraperitonealmente una dosis de 250 mg de SAC/Kg de peso, 24 h antes de iniciar el tratamiento con GM y durante los 4 días de tratamiento con GM recibieron cada 12 h, 125 mg/Kg de peso intraperitonealmente.

En los protocolos de EAE y SAC, los animales se colocaron en jaulas metabólicas para la recolección de la orina de 24 h y se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz y 12 h oscuridad, con libre acceso al alimento y al H₂O. Los animales se pesaron antes de iniciar el tratamiento con GM y los días de recolección de la orina (0, 3 y 5 para el protocolo con EAE y 0, 4 y 5 para el protocolo con SAC). Los animales se sacrificaron por decapitación para obtener la sangre y los riñones 12 h después de la última inyección con GM.

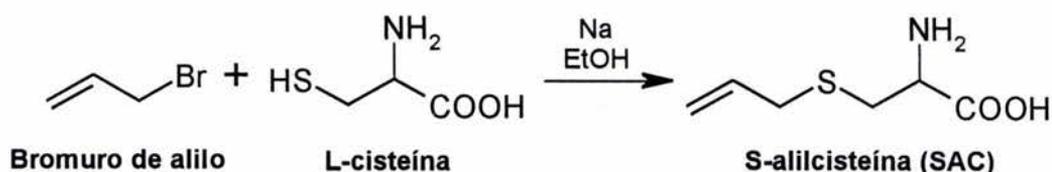
Por otro lado, en el protocolo donde se evaluó el efecto de diferentes dosis de SAC, los animales se sacrificaron por decapitación para obtener la sangre y los riñones 12 h después de la última inyección con GM.



2.4 Síntesis de SAC

Debido a que no se puede adquirir comercialmente la SAC, está se sintetizó en el laboratorio de la siguiente manera:

Se pesaron 5.25 g (0.03 mol) de cloruro de L-cisteína monohidratada y se colocaron en un matraz de bola con 90 mL de etanol absoluto, bajo condiciones de agitación. A la mezcla anterior se adicionaron 2.76 g de sodio en un intervalo de 1 h a T_{amb} y con agitación constante. Cuando la última pieza de sodio se disolvió se adicionaron 2.7 mL (0.031 mol) de bromuro de alilo y la reacción se dejó agitando durante 1 h a T_{amb} (Esquema 5). Al cabo de este tiempo, se adicionó H_2O fría suficiente para formar una solución que se dejó en agitación durante 1 h a T_{amb} . Finalmente, se evaporó el etanol y a la fase acuosa se le adicionó ácido acético glacial hasta alcanzar un pH de 5. El precipitado blanco que se generó, se filtró a vacío y se lavó con etanol frío (Lawson *et al.*, 1991).



Esquema 5. Reacción de síntesis de la S-aliicisteína (SAC) a partir de L-cisteína y bromuro de alilo.

Al compuesto obtenido se le determinó el punto de fusión (en un aparato Fisher-Johns) y se analizó por resonancia magnética nuclear protónica (RMN^1H). El espectro de RMN^1H , se obtuvo en un espectrometro Varian VXR a 300 MHz, empleando D_2O como disolvente y se registró en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química, UNAM.

El punto de fusión y el espectro de RMN^1H del producto, se compararon con los de un producto estándar.

2.5 Métodos empleados

2.5.1 Evaluación de la capacidad antioxidante del EAE y la SAC

1. Anión superóxido (O_2^-)

A. Método enzimático

Este método se basa en la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por el O_2^- generado de la oxidación de la xantina a ácido úrico por la xantina oxidasa (Bielski *et al.*, 1980).



Se preparó una solución sustrato con la siguiente composición: xantina 0.3 mM, Na₂CO₃ 0.4 M y NBT 150 μM en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0). El ensayo se realizó colocando en una celda de cuarzo 782 μL de solución sustrato, 170 μL de muestra y 170 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0). La reacción se inició con la adición de 48 μL de xantina oxidasa (8 U) y se obtuvieron simultáneamente las lecturas a 295 nm y 560 nm cada min durante 3 min. Se preparó un tubo de 100% de reducción el cual contenía 170 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0) en lugar de la muestra. Es necesario medir la absorbancia a 295 nm (ácido úrico), para asegurar que el compuesto en estudio no afecta la actividad de la xantina oxidasa (Owen & Johns, 1999). Los datos de producción de O₂⁻ se expresan como % O₂⁻ atrapado mientras que los de producción de ácido úrico como ΔDO₂₉₅/min.

B. Método no enzimático

En este método la fenasina metosulfato (PMS) se usó como un transportador de electrones entre el NADH y el NBT (Nishikimi *et al.*, 1972).

Para cada muestra se preparó una mezcla de reacción que contenía en concentración final: 10 μL de DMSO, 940 μL de HEPES 20 mM (pH 7.2), 50 μL de PMS 3.92 μM, 50 μL de NBT 39.2 μM y 100 μL de muestra. La reacción se inició con la adición de 100 μL de NADH 2.5 mM a la mezcla de reacción. Se registraron las lecturas cada min durante 3 min a 560 nm. Se preparó un tubo de 100% de reducción el cual contenía HEPES 20 mM (pH 7.2) en lugar de muestra. Los datos se expresan como % O₂⁻ atrapado.

2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ fue medido por el método colorimétrico FOX (oxidación del naranja de xilenol por el ion ferroso) donde el H₂O₂ oxida al Fe²⁺ a Fe³⁺ formando un cromógeno con el naranja de xilenol (Long *et al.*, 1999).

Se preparó el reactivo FOX colocando 9 volúmenes de butiraldehído tolueno 4.4 mM en metanol HPLC y 1 volumen de naranja de xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniaco 2.56 mM en H₂SO₄ 0.25 M. Se colocaron en un tubo: 45 μL de muestra, 45 μL de H₂O₂, 10 μL de metanol HPLC y 900 μL del reactivo de FOX. Los tubos se agitaron y se incubaron a T_{amb} por 10 min;



posteriormente, se centrifugaron a 15,000 x g por 20 min y se leyó la absorbancia a 560 nm contra un blanco de metanol. La cantidad de H₂O₂ se calculó usando una curva estándar de H₂O₂ (2.5-7.5 μM). Los datos se expresan como % H₂O₂ atrapado.

3. Radical hidroxilo (OH)

El OH se midió por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA); en el cual, los OH son generados de la reacción del complejo Fe/EDTA con H₂O₂. El OH en presencia de desoxirribosa forma productos, que bajo calentamiento con TBA y pH ácido, forman un cromógeno rosa (debido a la reacción entre el malondialdehído y el TBA). El malondialdehído es un producto de la reacción de descomposición del anillo de la desoxirribosa por el OH (Halliwell *et al.*, 1987; Barhomeuf *et al.*, 2001).

Se colocó en un tubo de vidrio los siguientes compuestos a las concentraciones finales indicadas: ácido ascórbico 0.2 mM, desoxirribosa 0.56 mM, H₂O₂ 1 mM, EDTA 0.208 mM, FeCl₃ 0.2 mM, amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 7.4) y la muestra. Esta mezcla de reacción se agitó y se incubó durante 1 h a 37°C. Se preparó por separado la solución de TBA, la cual contenía TBA, HCl, TCA y DFO. Posteriormente, se añadió a cada tubo (incluidos el blanco y los estándares) 1 mL de la solución de TBA, se agitaron durante 10 seg y se calentaron a 100°C durante 10 min. Los tubos se dejaron enfriar a T_{amb} y se leyó la absorbancia a 532 nm. Se preparó un tubo de 100% de producción de OH (con amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 7.4) en lugar de muestra), contra el que se calculó el % de OH atrapado. La cantidad de malondialdehído se calculó usando una curva estándar de tetrametoxipropano (0.37-14.8 nmol). Los datos se expresan como % OH atrapado.

4. Radical ABTS

En este método el ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) es oxidado al catión ABTS^{•+} (radical colorido) que absorbe a 734 nm (Long & Halliwell, 2001).

Se preparó una mezcla de reacción que contenía: ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2.45 mM, la cual se dejó incubando a T_{amb} y en oscuridad durante toda la noche. La solución de ABTS^{•+} se diluyó con H₂O, hasta obtener una absorbancia de aproximadamente 0.7 a 734 nm (aproximadamente 9 μL de ABTS y 991 μL de H₂O). En una celda de cuarzo, se añadieron 10 μL del compuesto a estudiar y 1 mL de la solución de ABTS^{•+}. Se registraron las lecturas cada



MATERIAL Y MÉTODOS

15 seg durante 1 min a 734 nm. Se preparó un tubo que en lugar de muestra, contenía 10 μL de H_2O , para ver la formación de radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, el cual se consideró como 100%.

2.5.2 Evaluación de la función renal

1. Función tubular

A. Cuantificación de proteínas en la orina

Se determinaron por el método turbidimétrico con ácido tricloroacético (TCA) (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1999).

Se incubó 10 min a temperatura ambiente 1 mL de orina diluida 1:5 (con NaCl 0.9%: SSI) con 250 μL de TCA 12.5% y se leyó la absorbancia a 420 nm. Se preparó un blanco para cada muestra que contenía 1 mL de orina diluida y 250 μL de SSI. Las absorbancias se interpolaron en una curva estándar de albúmina (0.04-0.8 mg/mL). Los datos se expresan en mg/24 h.

El aumento en la excreción urinaria de proteínas puede reflejar daño glomerular o tubular (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1995).

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

La actividad de NAG se midió usando un ensayo que emplea p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminido como sustrato (Jung *et al.*, 1991).

Se colocaron 100 μL de orina en un tubo que contenía 750 μL de amortiguador de citrato 50 mM (pH 4.4) y 250 μL de sustrato en una concentración final de 6.8 mM. Para cada muestra se preparó un blanco con orina y citrato y simultáneamente se preparó un blanco de comparación que contenía citrato, sustrato y H_2O ; todos los tubos se incubaron 15 min a 37°C. En este método, la NAG libera el p-nitrofenol del sustrato el cual se midió a 405 nm. Bajo estas condiciones, la producción de p-nitrofenol fue lineal con relación al tiempo y la cantidad de orina. Las absorbancias se interpolaron en una curva estándar p-nitrofenol (4.68-150 nM). Los datos se expresan en U/24 h. Una unidad de NAG se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol en las condiciones de estudio.



La excreción urinaria de enzimas lisosomales, como la NAG, se ha empleado como un indicador de daño en el túbulo proximal (Wellwood *et al.*, 1976).

C. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en el suero

Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976), en el cual la GPx cataliza la reducción del H_2O_2 acoplado a la oxidación del GSH a GSSG, el cual a su vez es reducido por la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH. La disminución de la concentración de NADPH se detectó a 340 nm.

El suero se diluyó 1:8 en amortiguador de fosfatos 50 mM pH (7.0) y 100 μ L de esta dilución se mezclaron con 800 μ L de una solución en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0), de la siguiente composición: EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y 1 U de GR/mL. De la misma manera, se preparó un tubo de actividad inespecífica con 100 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0). Los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y su contenido se adicionó a una celda de cuarzo que contenía 100 μ L de H_2O_2 0.25 mM e inmediatamente se leyó la absorbancia a 340 nm cada min durante 3 min.

La actividad de GPx se determinó promediando los cambios de absorbancia por min de la muestra menos el promedio de los cambios de absorbancia por min del inespecífico y multiplicando este valor por 12.8, factor que se obtiene del coeficiente absorción milimolar del NADPH (6.22) y el factor de dilución (8). Los datos se expresan como U/mL. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por min.

La GPx plasmática se sintetiza exclusivamente en las células renales del túbulo proximal (Avisar *et al.*, 1994) por lo que se ha empleado como un marcador de daño tubular (Whitin *et al.*, 1998).

D. Cuantificación del daño tubular por microscopía de luz

Después de sacrificar las ratas, se extrajeron los riñones inmediatamente y se obtuvo una rebanada de la corteza, la cual se fijó en 1 mL de formaldehído 10% en PBS. Posteriormente, este corte se deshidrató gradualmente en etanol absoluto seguido de xilol y se embebió en



parafina. Con un microtomo se obtuvieron cortes de 4 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E).

La cuantificación del daño tubular se realizó con un analizador de imágenes de Leica Qwin (Cambridge, England). Se realizó el perfil histológico de 20 túbulos proximales por rata, seleccionados al azar (6 ratas por grupo). Para ello, se midió el área total (μm^2) y el área ocupada por las células epiteliales con alteraciones histológicas como: vacuolización citoplásmica, descamación y necrosis. De esta manera, se calculó el % de área tubular afectada. Se realizó un promedio del área tubular dañada por rata y con los datos obtenidos se hizo un promedio final para cada grupo.

2. Función glomerular

A. Creatinina en el suero

La creatinina en el suero se determinó por la reacción de Jaffé, utilizando un estuche comercial. En esta reacción, la creatinina forma un complejo colorido con el picrato en medio alcalino que absorbe a 520 nm.

Se preparó un tubo como blanco que contenía: 50 μL de H_2O y 500 μL de ácido pícrico en NaOH (con el que se calibró el aparato) y un tubo como estándar que contenía: 50 μL de un estándar de creatinina (2 mg/dL) y 500 μL de ácido pícrico en NaOH. De la misma manera, se prepararon las muestras, colocando en una celda de cuarzo: 50 μL de suero y 500 μL de la solución de ácido pícrico en NaOH. Se realizó una cinética a 520 nm, durante 1.5 min tomando lecturas cada 30 seg.

Se calculó la diferencia de absorbancias a los 1.5 min menos la absorbancia a los 0.5 min (Δ Abs) del estándar y las muestras. Con estos valores y considerando que la concentración del estándar fue de 2 mg/dL, se calculó la concentración de creatinina en el suero. Los datos de creatinina en el suero se expresan en mg/dL.

La concentración de creatinina en el suero es un marcador de la función renal, ya que es un índice de la velocidad de filtración glomerular (Schor *et al.*, 1981).



B. Nitrógeno de la urea en la sangre (BUN)

La concentración de BUN se midió a 340 nm empleando un estuche comercial. En este método, la urea presente en la muestra es hidrolizada por la ureasa a amonio y CO₂. Por otro lado, en una reacción acoplada el α -cetoglutarato y el NADH presentes en el medio, reaccionan utilizando el amonio producido por la ureasa, convirtiendo el α -cetoglutarato en L-glutamato por la glutamato deshidrogenasa. El consumo de NADH disminuye la absorbancia a 340 nm.

Se colocaron en una celda de cuarzo 10 μ L de suero y se adicionó 1 mL de una mezcla de reacción que contenía ureasa, α -cetoglutarato, NADH y glutamato deshidrogenasa. La reacción se siguió a 340 nm con lecturas cada 30 seg durante 2.5 min. En las mismas condiciones se incluyó un blanco que contenía sólo la mezcla de reacción y un estándar de urea de 80 mg/dL.

Se calculó la diferencia de absorbancias a los 0.5 min y a los 2.5 min (Δ Abs) del estándar y las muestras. Con estos valores y tomando en cuenta que la concentración del estándar fue 80 mg de urea/dL, se obtuvo la concentración de urea en el plasma. Finalmente, la cantidad de BUN se obtuvo dividiendo la concentración de urea en el plasma (mg/dL) entre 2.14, factor que se obtiene de dividir 60/28 (peso de la urea/peso del nitrógeno contenido en la urea). Los datos se expresan en mg/dL.

Un aumento en los niveles circulantes de BUN puede ser consecuencia de una disminución en la velocidad de filtración glomerular (Schor *et al.*, 1981).

2.5.3 Evaluación del estrés oxidativo en la corteza renal

1. Contenido de grupos carbonilo en las proteínas (proteínas oxidadas)

Los grupos carbonilo se detectaron por la reacción de éstos con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas de proteínas (Reznick & Packer, 1994).

La corteza renal (100 mg) se homogenizó en 900 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) que contenía un cóctel de antiproteasas (leupeptina 5 μ g/mL, pepstatina 7 μ g/mL y aprotonina 5 μ g/mL), EDTA 1 mM y Tritón X-100 0.1% empleando un politrón Kinematica® de Brinkman Instruments, Inc. (Suiza) a máxima velocidad durante 10 seg. Los homogenizados se centrifugaron a 20,937 x g por 30 min a 4°C.



MATERIAL Y MÉTODOS

Se incubaron 300 μL del homogenizado con 100 μL de sulfato de estreptomicina 10%, para eliminar los ácidos nucleicos de las muestras. Las muestras se incubaron 24 h a 4°C y se centrifugaron a 20,937 x g por 40 min a 4°C. Se tomaron del sobrenadante dos alícuotas de 150 μL cada una en tubos eppendorf, a un tubo se le adicionaron 600 μL de DNPH 10 mM en HCl 2.5 M y al otro 600 μL de HCl 2.5 M. Los tubos se incubaron 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad, agitándolos cada 15 min. Posteriormente, se adicionó 750 μL de TCA 20% a cada uno de los tubos y se incubaron a 4°C por 10 min, se centrifugaron a 2,236 x g por 10 min a 4°C; después, el sobrenadante se descartó y se realizó otro lavado con 600 μL de TCA 10%, se centrifugaron los tubos a 2,236 x g por 10 min a 4°C. Finalmente, los precipitados se lavaron 3 veces con 600 μL de etanol-acetato de etilo 1:1 para remover el DNPH libre y los lípidos contaminantes. El precipitado final se disolvió en 1 mL de guanidina 6 M en amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 2.3).

Los tubos se leyeron a 370 nm y el contenido de carbonilos se calculó empleando el coeficiente de absorción molar de la DNPH (22,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El tubo de HCl se usó como blanco para cada muestra.

El contenido total de proteína en el precipitado final se determinó en los tubos con HCl por la lectura a 280 nm, empleando una curva estándar de albúmina (0.26-2.0 mg/mL) disuelta en guanidina 6 M. Los resultados se expresan como nmol/mg proteína.

El contenido de grupos carbonilo en las proteínas se ha usado como un marcador de daño oxidativo a proteínas bajo condiciones de estrés oxidativo (Stadtman, 1992), ya que las ERO's llevan a la formación de derivados carbonílicos, porque atacan a las proteínas en ciertos aminoácidos como arginina, prolina o lisina (Dean *et al.*, 1997).

2. Contenido de nitrotirosina y de 4-hidroxinonenal (4-HNE) por inmunohistoquímica

Se prepararon cortes de corteza renal de 4 μm de grosor, se desparafinaron con xilol y se rehidrataron con etanol. Se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con H_2O_2 4.5% en metanol por 1.5 h a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras con PBS y se incubaron en una cámara húmeda por 30 min con albúmina al 3% en PBS (agente de bloqueo). Después, las



muestras se lavaron y se incubaron toda la noche con el anticuerpo anti-nitrotirosina o anti-4-HNE diluidos 1:700 y 1:100, respectivamente, en albúmina 1% en PBS. Las muestras con el anticuerpo primario (anti-nitrotirosina o anti-4-HNE), se lavaron y se incubaron durante 1 h con un anticuerpo peroxidado anti-IgG de conejo o de ratón respectivamente, diluidos 1:250 en PBS. Las muestras se lavaron y se incubaron 1 min con DAB-H₂O₂ y se lavaron de inmediato. Finalmente, los cortes se tiñeron con hematoxilina para dar contraste a los componentes del tejido, se deshidrataron y se montaron con resina para su análisis en un microscopio de luz. Se realizó un control negativo (sin la adición del primer anticuerpo) y no se observó señal (Barrera *et al.*, 2003).

La nitración de proteínas por el radical peroxinitrito puede alterar la actividad de proteínas y es un índice de estrés nitrosativo ya que se forma de la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico (MacMillan-Crow & Thompson, 1999).

2.5.4 Actividad y cantidad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal

Se preparó un homogenizado de corteza 1:10, pesando 100 mg de corteza en 900 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0) con Tritón X-100 1%. Los homogenizados se centrifugaron a 20,937 x g durante 1 h a 4°C y el sobrenadante se empleó en las determinaciones enzimáticas como se menciona a continuación:

1. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

A. SOD total

La actividad de SOD total se determinó por la reducción del NBT (Oberley & Spitz, 1984).

Se preparó xantina oxidasa 168 U/L y una mezcla de reacción de la siguiente composición: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 µM, albúmina 0.006% y Na₂CO₃ 49 mM. Se colocaron 2.45 mL de la mezcla de reacción en tubos y se mantuvieron a 27°C. Se adicionaron 500 µL del homogenizado de corteza, diluido 1:100 en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.0) e inmediatamente después la reacción se inició con la adición de 50 µL de xantina oxidasa (8.4 U). Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero sin xantina oxidasa. De manera simultánea, se preparó un tubo de 100% de reducción del NBT el cual contenía xantina oxidasa pero sin homogenizado. Los tubos se incubaron 30 min, se les adicionó 1 mL de CuCl₂ 0.8 mM y se leyó la absorbancia a 560 nm. Bajo estas condiciones, la reducción del



MATERIAL Y MÉTODOS

NBT es lineal con concentraciones crecientes del enzima pura de CuZn-SOD. Los datos se expresan como U/mg proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

B. SOD de manganeso (Mn-SOD)

Los homogenizados se incubaron con dietilditiocarbamato (DDC) 50 mM 1 h a 30°C (100 µL de homogenizado + 100 µL de DDC 100 mM) para inactivar la isomorfa CuZn-SOD. Posteriormente, el homogenizado tratado con el DDC se dializó realizando dos cambios de 400 volúmenes en amortiguador de fosfatos 5 mM y EDTA 0.1 mM (pH 7.8) cada hora (Iqbal & Whitney, 1991). Para determinar la actividad de la Mn-SOD se siguió el mismo procedimiento que SOD total, sólo que el homogenizado se diluyó 1:50. Los datos se expresan en U/mg proteína.

C. SOD de cobre y zinc (CuZn-SOD)

La actividad de la CuZn-SOD se obtuvo restando la actividad de la Mn-SOD de la actividad de la SOD total. Los resultados se expresan como U/mg proteína.

2. Actividad de la catalasa (CAT)

Para esta determinación se usó el método de Aebi (1982) que mide la desaparición de H₂O₂ a 240 nm.

En una celda de cuarzo se colocaron 25 µL del homogenizado diluido 1:33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7) y se le adicionaron 725 µL de H₂O₂ 7.7 mM e inmediatamente se midió el cambio de absorbancia a 240 nm a los 15 seg y 30 seg. De acuerdo a Aebi, 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: $k = (1/t)(2.3 \times \log A_1/A_2)$ donde t = intervalo de tiempo medido, A_1 y A_2 son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresan como k /mg proteína.

3. Actividad de la GPx

Se empleó el mismo método descrito anteriormente para medir la actividad de GPx en el suero. El homogenizado se diluyó 1:10 y los datos se expresan como U/mg proteína.



4. Actividad de la glutatión reductasa (GR)

Se empleó el método de Carlberg & Mannervik (1975), en el que se mide la desaparición de NADPH a 340 nm ya que la GR cataliza la conversión de GSSG a GSH, reacción que requiere de este cofactor.

Se preparó una mezcla de reacción en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.6) que contenía en concentración final: EDTA 0.5 mM, GSSG 1.25 mM y NADPH 0.1 mM. Se colocaron en un tubo 950 μ L de la mezcla de reacción y 50 μ L del homogenizado diluido 1:5 en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.6), los tubos se agitaron e inmediatamente se leyó la absorbancia a 340 nm cada min durante 3 min.

La actividad de GR se determinó promediando los cambios de absorbancia por min de la muestra y multiplicando este valor por 0.16 (la inversa de 6.22, el coeficiente absorción milimolar del NADPH). Los datos se expresan como U/mg proteína. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por min.

5. Cantidad de las enzimas antioxidantes por western blot

Se homogenizaron 100 mg de corteza en 300 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7.4) que contenía un cóctel de antiproteasas (leupeptina 5 μ g/mL, pepstatina 7 μ g/mL y aprotonina 5 μ g/mL) y EDTA 1 mM. Se midió el contenido de proteína en los homogenizados por el método de Lowry y se hicieron alícuotas de 5 μ g/ μ L.

Se prepararon dos geles de acrilamida en un soporte Mighty Small™ SE 245 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA) con el gel de resolución al 12% y el gel concentrador al 5% según el método de Laemmli (1970), los cuales se montaron en una cámara de electroforesis Mighty Small™ SE 250 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA). En tubos Eppendorf, se desnaturalizaron 6 μ L del homogenizado (5 μ g/ μ L) con 6 μ L de una solución desnaturalizante (Tris-HCl 50 mM (pH 6.8), DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1% y glicerol 10%) durante 1 min en H₂O hirviendo. El contenido de los tubos se colocó en los pozos de los geles de acrilamida y se corrió la electroforesis durante 2 h a 100 V. Uno de los geles se tiñó 2 h con azul de Coomassie como control de la cantidad de proteína. Las proteínas del otro gel se transfirieron durante 2 h a 400 mA a una membrana de



nitrocelulosa de Hybond ECL, Amersham, Life Science (Buckinghamshire, England) con una cámara de transferencia Mighty Small™ TE 22 de Hoefer® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA). Para comprobar que la transferencia de proteínas fue completa, al final de ésta, el gel se tiñó 2 h con azul de Coomassie. Los geles teñidos se destiñeron con metanol:H₂O 1:1 y ácido acético. La ausencia de bandas indicó una transferencia completa.

Para el western blot, se bloquearon las membranas con leche Svelty 5% en PBS durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación. Después se realizaron dos lavados de 20 min con PBS y se incubaron las membranas con agitación 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos comerciales anti-CuZn-SOD, anti-Mn-SOD y anti-CAT. Después de otros dos lavados de 20 min con PBS, se incubaron las membranas con un anticuerpo acoplado a la peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron dos veces más con PBS durante 20 min. Los anticuerpos unidos a la membrana se observaron usando un sistema de detección que emplea quimioluminiscencia.

Bajo estas condiciones, la intensidad de las manchas fue lineal con concentraciones crecientes de proteína (5-100 µg). La cantidad de proteína empleada en el ensayo (30 µg), cae dentro de este intervalo.

Los datos se cuantificaron por densitometría (Sigma ScanPro, version 4.0, San Rafael, CA, USA) y se expresan como % tomando a los controles como 100%.

6. Cuantificación de proteínas en el riñón

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

2.5.5 Determinación del contenido de GM en la corteza renal

La GM se midió en homogenizados de corteza con un inmunoensayo de fluorescencia polarizada, empleando el sistema TDX-GM de los laboratorios Abbot (Abbott Park, IL). El homogenizado se diluyó en un amortiguador TDX para obtener concentraciones entre 3 y 7 µg/mL. El contenido de GM en la corteza se expresa como µg/mg proteína.

Los resultados se interpolaron en una curva de GM (0.5-10 µg/mL).



2.5.6 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. Los datos se analizaron con el programa Prism 2.01, Graph Pad (San Diego, CA) mediante ANOVA y comparaciones múltiples de Bonferroni. Los datos obtenidos de la histología y del contenido renal de la GM, se analizaron mediante una prueba de la *t de Student* no pareada. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

2.5.7 Efecto de la SAC sobre la capacidad bactericida de la GM

Se prepararon cajas Petri de 10 cm con agar Mueller Hinton (M-H). Como controles se empleó una caja con agar M-H sin GM y sin SAC y una caja sin GM y con 50 mg/mL de SAC en concentración final.

Por otro lado, se prepararon 6 cajas con agar M-H, a las que se les adicionó GM en las siguientes concentraciones finales: 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 y 2.4 mg/mL. A otras 6 cajas con las mismas concentraciones finales de GM se les adicionó 50 mg/mL de SAC en concentración final.

Todas las cajas se inocularon con 1 μ L de una suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922, de una concentración de 0.5 de la escala de MacFarland y se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se contó el número de colonias (Washington, 1985). Los resultados se expresan en UFC (unidades formadoras de colonias).

3. IDENTIFICACIÓN DE LA ALICINA Y LA SAC POR HPLC

Los estudios de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se realizaron en un cromatógrafo de la marca Waters®. Para la separación, se empleó una columna analítica NOVA-Pak® HRC18 de 3.9 mm de diámetro interno, 300 mm de largo y un tamaño de partícula de 6 micras. La identificación de alicina y de SAC se realizó empleando un detector Dual de UV 2487 a una longitud de onda de 254 nm.

3.1 Identificación de la alicina en un extracto acuoso de ajo (EAA)

3.1.1 Preparación del EAA a partir de polvo de ajo

Se adicionaron 3 mL de agua destilada a 0.5 g de polvo de ajo en oscuridad, la suspensión se agitó durante 15 min y se dejó incubando durante 15 min a temperatura ambiente.



Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 8000 x g durante 5 min. El sobrenadante se empleó para la identificación de alicina por HPLC (Iberl *et al.*, 1990).

3.1.2 Identificación de la alicina

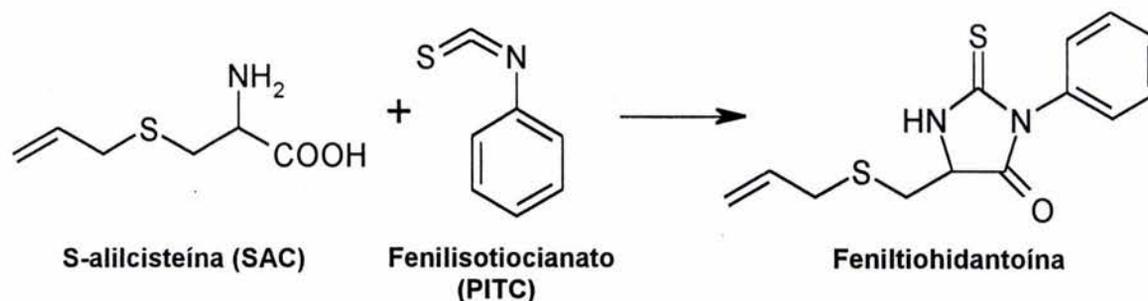
Se emplearon 2 sistemas de elución: 1) metanol:H₂O 60:40 y 2) acetonitrilo:H₂O:metanol 50:41:9, con un flujo de 0.2 mL/min para ambos (Iberl *et al.*, 1990).

En los dos sistemas de elución empleados, se obtuvieron tres cromatogramas: 1) Estándar de alicina: se inyectaron 20 µL de estándar de alicina (1 mg alicina/200 µL H₂O), 2) Extracto acuoso de ajo: se inyectaron 20 µL del extracto acuoso (preparado como se mencionó en el punto anterior) y 3) Co-cromatografía: se inyectaron 20 µL de una solución que contenía 40 µL del extracto acuoso (preparado como se mencionó en el punto anterior) + 20 µL del estándar de alicina (1 mg alicina/200 µL H₂O).

3.2 Identificación de la SAC en el EAE

3.2.1 Reacción de derivatización e identificación de la SAC

La identificación de SAC en el EAE se realizó a través de una reacción de derivatización, empleando fenilisotiocianato (PITC), Esquema 6 (Nagae *et al.*, 1994).



Esquema 6. Reacción de derivatización entre la SAC y el fenilisotiocianato (PITC).

Se efectuaron tres reacciones de derivatización: 1) SAC-St, 2) EAE y 3) EAE + SAC-St.

Para las reacciones 1 y 2 se pesaron 10 mg de la muestra (SAC-St y EAE, respectivamente) y para la reacción 3 se pesaron 10 mg de EAE + 10 mg de SAC-St. Posteriormente, a todas las mezclas se adicionaron 100 µL de la solución de PITC (metanol:triethylamina:PITC:H₂O 7:1:1:1) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se evaporó el exceso de PITC; el precipitado resultante se resuspendió en 450 µL de acetonitrilo 35% y se filtró. Cada filtrado se diluyó 1:100 con acetonitrilo 35% y se inyectaron 50 µL al equipo de HPLC. Como



sistema de elución se empleó acetonitrilo:H₂O 70:30, con un flujo de 0.3 mL/min (Nagae *et al.*, 1994).

4. ESTUDIOS *in vitro*

4.1 Cultivo de las células LLC-PK₁

Estos estudios se realizaron en células LLC-PK₁, que es una línea celular epitelial de túbulo proximal porcina bien caracterizada y ampliamente utilizada (Ford *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 1986). Para ello, las células se cultivaron en cajas Petri de 10 cm con medio DMEM suplementado con SFB al 10% (pH 7.3) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de O₂ y 5% de CO₂. Dado que en este estudio la GM es una de las condiciones experimentales, el medio de cultivo no se suplementó con este antibiótico durante los ensayos. Las células se subcultivaron dos veces a la semana, antes de alcanzar la confluencia. Para esto, las células se lavaron con una solución salina de PBS y se desprendieron de la caja, con una solución salina de PBS suplementada con tripsina al 0.25% para hacer la transferencia a nuevas cajas Petri.

En todos los experimentos, las células se sembraron en cajas de 96 pozos y se realizaron en confluencia, la cual se evaluó revisando las cajas al microscopio. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de esterilidad.

4.2 Estudio dosis-respuesta con GM

Para obtener la dosis letal 50 (DL₅₀) de GM, se realizó una curva con este antibiótico (estudio dosis-respuesta de viabilidad), durante 3 días (Ford *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 1986). En este ensayo se incluyeron los siguientes grupos: control (CT) y tratado con GM (GM) y se siguió el siguiente protocolo:

CT	Cultivos celulares que recibieron 100 µL de medio de cultivo (DMEM), que no contenía GM y estaba suplementado con SFB al 10%.
GM	Cultivos celulares que recibieron 100 µL de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de GM: 0.1, 0.5, 2, 4, 8, 16, 30, 60 y 100 mM.

En ambos grupos, el medio se recambió cada 24 h por medio fresco, hasta que terminó el estudio. La viabilidad se midió con un ensayo colorimétrico utilizando cristal violeta. De estos estudios se obtuvo la DL₅₀ de GM y el tiempo que se empleó en los estudios posteriores, donde se evaluó el efecto del EAA, el EAE, la alina, la alicina y la SAC.



4.3 Efecto del EAA, el EAE, la alina, la alicina y la SAC

Estos experimentos se desarrollaron durante 3 días y se incluyeron los siguientes grupos: 1) control (CT); 2) tratado con GM (GM); 3) tratado con EAA o EAE o alina o alicina o SAC y 4) tratado con GM y EAA o EAE (GM+EAA o GM+EAE) o alina o alicina o SAC (GM+alina o GM+alicina o GM+SAC). Para estos estudios se empleó el siguiente protocolo:

CT	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), que no contenía GM y estaba suplementado con SFB al 10%.
GM	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y GM en concentración final de 8 mM.
EAA	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de EAA: 0.12, 0.25, 0.5 y 1%.
GM+EAA	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de EAA: 0.12, 0.25, 0.5 y 1%.
EAE	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de EAE: 0.25, 0.5, 1 y 2%.
GM+EAE	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de EAE: 0.25, 0.5, 1 y 2%.
Alina	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de alina: 0.5, 1, 2, 4 y 6 mM.
GM+Alina	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de alina: 0.5, 1, 2, 4 y 6 mM.
Alicina	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de alicina: 50, 100, 200, 400 y 600 μ M.
GM+Alicina	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de alicina: 50, 100, 200, 400 y 600 μ M.
SAC	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de SAC: 0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 mM.
GM+SAC	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de SAC: 0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10 mM.

En cada uno de los grupos, el medio se recambió cada 24 h por medio fresco, hasta que terminó el estudio. La viabilidad se midió con un ensayo colorimétrico utilizando cristal violeta.



4.4 Efecto del EAA, el EAE, la alina, la SAC y la NAC administrados 12 h antes de la GM

Estos experimentos se desarrollaron durante 3 días y se incluyeron los siguientes grupos: 1) control (CT); 2) tratado con GM (GM); 3) tratado con EAA o EAE o alina o alicina o SAC y 4) tratado con GM y EAA o EAE (GM+EAA o GM+EAE) o alina o alicina o SAC (GM+Alina o GM+Alicina o GM+SAC). Para estos estudios, se empleó el siguiente protocolo:

CT	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), que no contenía GM y estaba suplementado con SFB al 10%.
GM	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y GM en concentración final de 8 mM.
EAA	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de EAA: 0.03, 0.06, 0.12, 0.25 y 0.5%.
GM+EAA	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de EAA: 0.03, 0.06, 0.12, 0.25 y 0.5%.
EAE	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de EAE: 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 y 2%.
GM+EAE	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de EAE: 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 y 2%.
Alina	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de alina: 0.5, 1, 2 y 4 mM.
GM+Alina	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de alina: 0.5, 1, 2 y 4 mM.
SAC	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de SAC: 0.5, 1, 2, 4 y 8 mM.
GM+SAC	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de SAC: 0.5, 1, 2, 4 y 8 mM.
NAC	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10% y las siguientes concentraciones finales de NAC: 0.25, 0.5, 1 y 2 mM.
GM+NAC	Cultivos celulares que recibieron 100 μ L de medio de cultivo (DMEM), suplementado con SFB al 10%, GM en concentración final de 8 mM y las siguientes concentraciones finales de NAC: 0.25, 0.5, 1 y 2 mM.



En estos experimentos, el tratamiento con EAA, EAE, alina, alicina, SAC y NAC inició 12 h antes de la administración de la GM. En cada uno de los grupos, el medio se recambió cada 24 h por medio fresco, hasta que terminó el estudio. La viabilidad se midió con un ensayo colorimétrico utilizando cristal violeta.

4.5 Métodos empleados

4.5.1 Viabilidad celular por cristal violeta

Después del tratamiento correspondiente de las células, se aspiró el medio de cultivo y se lavó cada uno de los pozos con PBS. Las células se fijaron a los pozos con 50 μ L de una solución de glutaraldehído al 1.1% en PBS durante 15 min a T_{amb} , después se adicionaron 100 μ L de cristal violeta 0.1% por 15 min y en agitación. Posteriormente, se realizaron lavados hasta que ya no salió color de las cajas. El cristal violeta unido a las proteínas celulares se disolvió en ácido acético al 10% y se leyó la absorbancia a 590 nm.

4.5.2 Análisis estadístico

Los resultados *in vitro*, se presentan como la media \pm la desviación estándar. Los datos se analizaron con el programa Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante ANOVA y comparaciones múltiples de Bonferroni. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.



VIII. RESULTADOS

1. ESTUDIOS *in vivo*

1.1 Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE)

1.1.1 Capacidad antioxidante del EAE

1. Anión superóxido (O_2^-)

El EAE atrapó al O_2^- de manera dosis dependiente detectado a través de la reducción del NBT, sin afectar la actividad de la xantina oxidasa (Figura 1 A y B). Dosis mayores a 5.51 mg/mL de EAE inhibieron la actividad de la xantina oxidasa, razón por la cual estas dosis no se consideraron en el ensayo (Datos no mostrados).

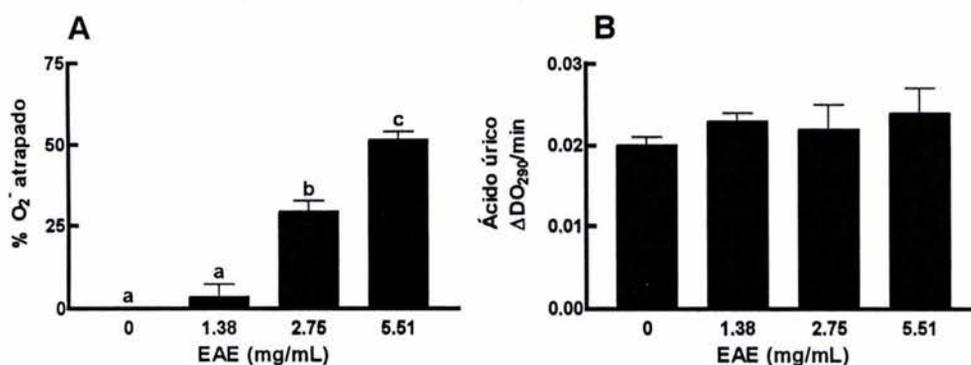


Figura 1. Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre (A) la producción de anión superóxido (O_2^-) generado del sistema xantina/xantina oxidasa y (B) la actividad de la xantina oxidasa. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4$.

Para corroborar los resultados obtenidos por el método enzimático, se evaluó el efecto del EAE sobre la producción de O_2^- , generado en un sistema no enzimático (PMS/NADH/NBT), encontrándose que el EAE atrapó O_2^- de manera dosis dependiente (Figura 2).

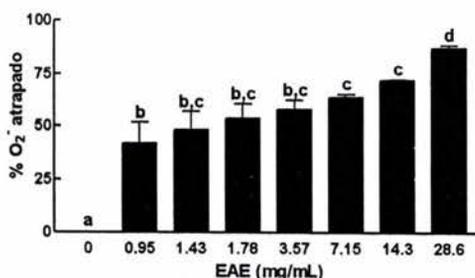


Figura 2. Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre la producción de anión superóxido (O_2^-) generado del sistema PMS/NADH/NBT. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 3$.



2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El EAE atrapó el H₂O₂ de manera dosis dependiente, siendo 2.5 mg/mL la concentración de EAE que atrapó el 100% de H₂O₂ empleado en la determinación (Figura 3).

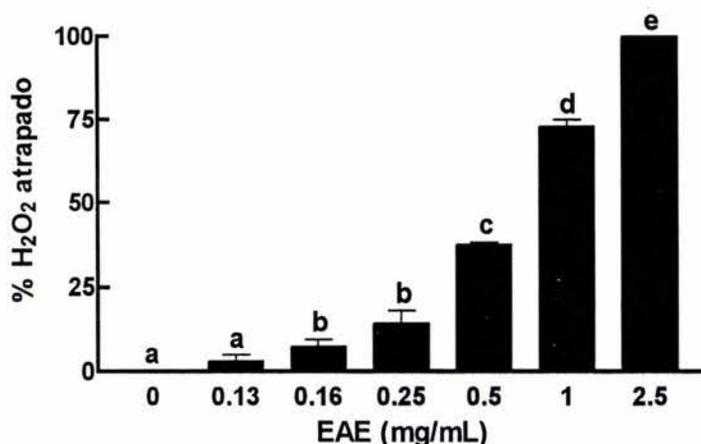


Figura 3. Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. *n* = 3.

3. Radical hidroxilo (OH)

La figura 4 muestra que el EAE atrapó al OH de manera dosis dependiente, hasta una concentración de 0.078%; ya que dosis mayores a ésta no muestran un efecto mayor.

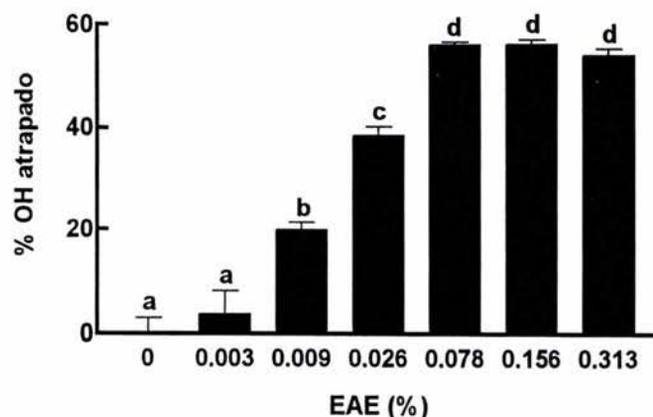


Figura 4. Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre el radical hidroxilo (OH). Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. La *n* = 4.



1.1.2 Evaluación de la función renal

1. Función tubular

A. Excreción de la NAG y de proteínas en la orina

En las figuras 5 A y B respectivamente, se observa que el tratamiento con GM indujo un incremento significativo en la excreción urinaria de la NAG y de proteínas a partir del día 3 de tratamiento; siendo el día 5 donde se observó el mayor incremento de 4.9 veces para la NAG y de 2.6 veces para proteínas. El EAE previno parcialmente el incremento inducido por la GM en la excreción urinaria de la NAG y de proteínas (grupo GM+EAE) al día 5, efecto que en el caso de la NAG se observó desde el día 3 de tratamiento con GM (Figura 5 B).

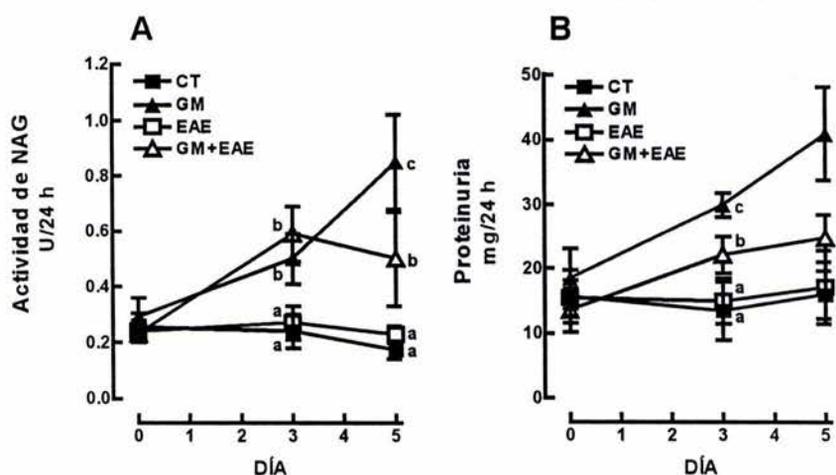


Figura 5. Efecto de la gentamicina (GM) y del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre la excreción urinaria de (A) N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) y (B) proteínas en la orina. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. La n = 5-6. CT: control.

B. Actividad de la GPx en suero

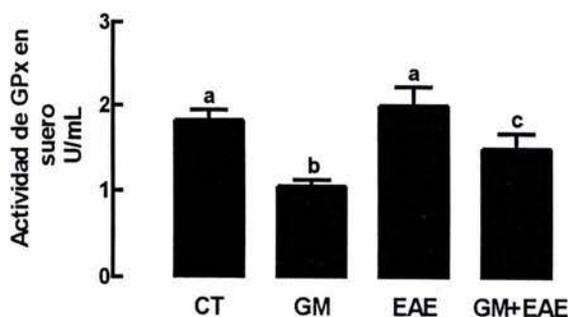


Figura 6. Efecto de la gentamicina (GM) y del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en suero en el día 5. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. n = 5-6. CT: control.

Falta página

N° 46



RESULTADOS

el incremento encontrado en las ratas tratadas con GM (GM+EAE: 23.5 ± 3.0 mg/dL). El EAE solo no tuvo efecto sobre los niveles de creatinina y de BUN (Figura 8 A y B).

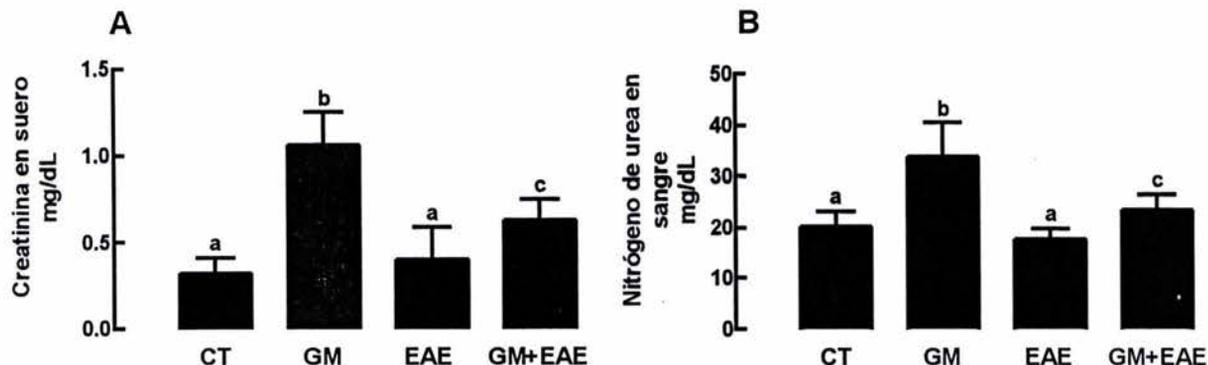


Figura 8. Efecto de la gentamicina (GM) y del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre la concentración de (A) creatinina en suero y (B) el nitrógeno de urea en sangre en el día 5. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 5-6$. CT: control.

1.1.3 Evaluación del estrés oxidativo en la corteza renal

1. Contenido de grupos carbonilo en las proteínas

En la figura 9 se muestra que la GM indujo un incremento del 32.6% en el contenido de grupos carbonilo en la corteza renal de las ratas tratadas con este antibiótico, comparado con el grupo control (CT: 13.2 ± 0.7 y GM: 17.5 ± 0.7 nmol/mg proteína), mientras que el tratamiento de los animales con EAE previno totalmente el incremento inducido por la GM (GM+EAE: 11.3 ± 0.9 nmol/mg proteína). También puede observarse que el EAE no alteró los niveles de proteínas oxidadas.

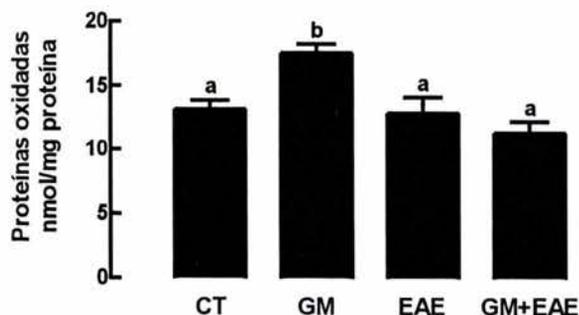


Figura 9. Efecto de la gentamicina (GM) y del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre los niveles en corteza renal de grupos carbonilo en proteínas en el día 5. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 5-6$. CT: control.



2. Contenido de nitrotirosina

En la corteza renal de las ratas tratadas con GM se observa una mayor tinción, debida al mayor nivel de proteínas nitradas, en las células de túbulo proximal, comparado con las ratas del grupo control. El EAE disminuyó notablemente la tinción observada en las ratas tratadas con GM (Figura 10, panel superior). El EAE no tuvo efecto sobre los niveles de nitrotirosina (Figura 10 A).

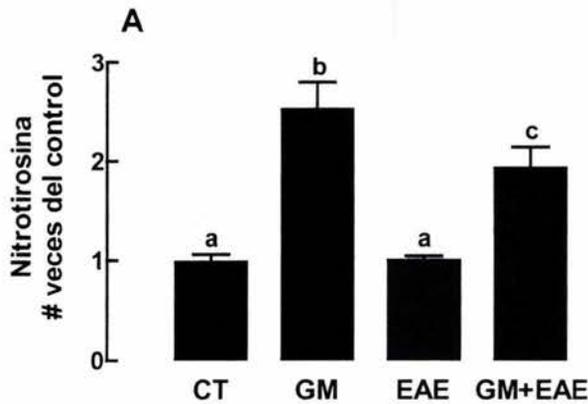
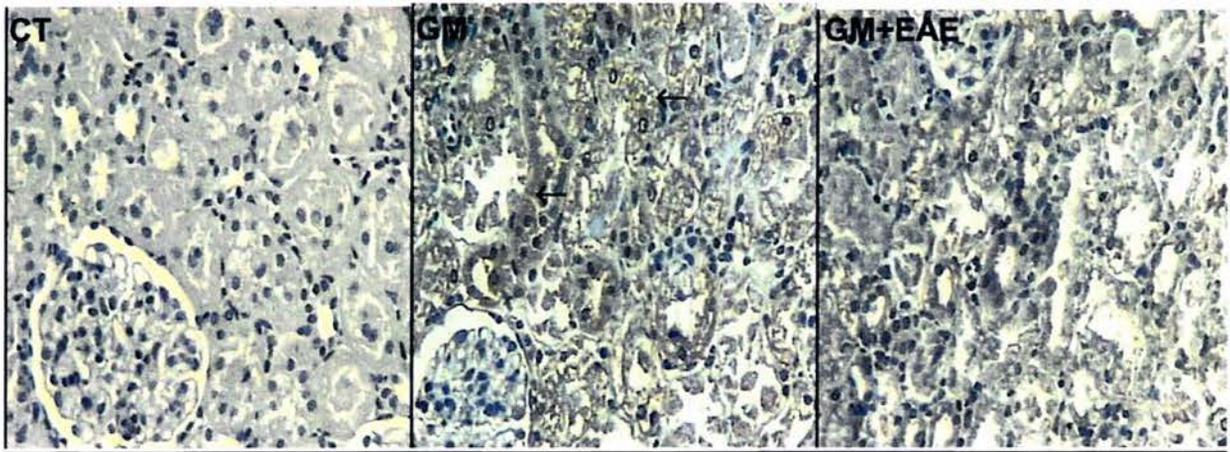


Figura 10. Foto representativa de microscopia de luz, del efecto de la gentamicina (GM) y del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre la formación de proteínas nitradas en la corteza renal de ratas. La tinción de nitrotirosina se muestra con flechas. 200x. (A) Gráfica que representa la cuantificación de los niveles de nitrotirosina en la corteza renal en el día 5. Los datos se presentan como media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. *n* = 5. CT: control.



RESULTADOS

1.1.4 Actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal

El tratamiento con GM disminuyó un 25.9% la actividad de la SOD total. Esta disminución se debe a que la actividad de la Mn-SOD disminuyó en un 42.2% en las ratas tratadas con GM, ya que la actividad de CuZn-SOD no cambió. En el grupo GM+EAE, el EAE previno la disminución en la actividad de la SOD total debido a que evitó la disminución en la actividad de la Mn-SOD (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la gentamicina (GM) y del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal en el día 5^{1,2}

	CT	GM	EAE	GM+EAE
SOD total (U/mg proteína)	17.4±0.9 ^a	12.9±1.1 ^b	17.1±0.8 ^a	16.2±0.9 ^a
Mn-SOD (U/mg proteína)	6.4±0.8 ^a	3.7±0.14 ^b	7.2±0.7 ^a	7.2±0.97 ^a
CuZn-SOD (U/mg proteína)	11.0±0.8 ^a	9.2±1.2 ^a	10.0±1.2 ^a	9.0±1.3 ^a
CAT (k/mg proteína)	0.64±0.04 ^a	0.31±0.06 ^b	0.69±0.06 ^a	0.37±0.03 ^b
GPx (U/mg proteína)	0.107±0.006 ^a	0.08±0.01 ^b	0.11±0.005 ^a	0.11±0.012 ^a
GR (U/mg proteína)	0.093±0.006 ^a	0.07±0.01 ^b	0.10±0.011 ^a	0.09±0.012 ^a

¹ Media±SD; las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas; *n* = 5-6.

² CT, control; SOD total, superóxido dismutasa total; Mn-SOD, superóxido dismutasa de manganeso; CuZn-SOD, superóxido dismutasa de cobre y zinc; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa y GR, glutatión reductasa.

La GM disminuyó un 51.6%, un 23.4% y un 23.7% la actividad de la CAT, la GPx y la GR, respectivamente, comparado con el grupo control. En las ratas tratadas con GM y con el EAE, éste no previno la disminución inducida por la GM en la actividad de la CAT; sin embargo, previno totalmente la disminución inducida por este antibiótico en la actividad de la GPx y de la GR (Tabla 1). El EAE no tuvo efecto sobre la actividad renal de la CAT, la GPx y la GR.

1.1.5 Cantidad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal

En la tabla 2 se observa que la GM y el EAE no indujeron cambios en la cantidad de proteína de Mn-SOD y CuZn-SOD, como se observa en el análisis densitométrico para ambas isomorfias de SOD. Por otro lado, la GM disminuyó la cantidad de CAT (32.6%); mientras que en el grupo GM + EAE, el tratamiento con EAE no previno esta disminución (Tabla 2).



RESULTADOS

Tabla 2. Efecto de la gentamicina (GM) y del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre la cantidad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal en el día 5^{1,2,3}.

	CT	GM	EAE	GM+EAE
Mn-SOD	100±6 ^a	103±15 ^a	102±5 ^a	95±11 ^a
CuZn-SOD	100±8 ^a	97±14 ^a	99±10 ^a	99±8 ^a
CAT	100±9 ^a	67±15 ^b	95±16 ^a	75±12 ^a

¹ Media±SD; las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas; $n = 5-6$.

² Los datos se expresan como % del grupo control (CT) y se obtuvieron del análisis densitométrico del Western blot de cada enzima.

³ Mn-SOD, superóxido dismutasa de manganeso; CuZn-SOD, superóxido dismutasa de cobre y zinc; CAT, catalasa.

1.1.6 Contenido de GM en la corteza renal

En la figura 11 se muestra que el tratamiento con EAE no tuvo efecto sobre el contenido de GM en la corteza renal (GM+EAE: 51.6±6), comparado con el grupo tratado con GM (47.5±12 µg/mg de proteína).

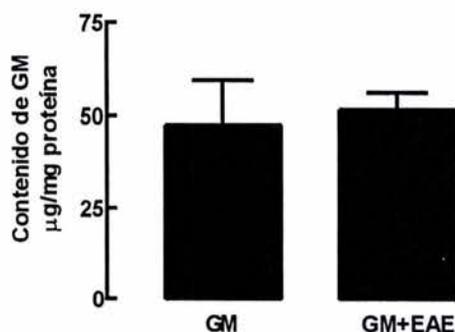


Figura 11. Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) sobre el contenido de gentamicina (GM) en corteza renal en el día 5. Los datos se presentan como media±desviación estándar. $n = 5$.



RESULTADOS

1.2 Efecto de la S-alilcisteína (SAC)

1.2.1 Identificación de la SAC obtenida por síntesis química

El punto de fusión del compuesto obtenido por síntesis química fue de 222-223°C, el cual se comparó con el punto de fusión del compuesto empleado como estándar y que fue de 222°C. El rendimiento de la reacción fue de 75.2%.

En la tabla 3 se observa que los desplazamientos mas relevantes del compuesto obtenido por síntesis química (derivado sintético), son idénticos a los del compuesto empleado como estándar.

Tabla 3. Desplazamientos de RMN¹H del estándar de SAC y del compuesto obtenido por síntesis química¹.

Posición	δ_H Estándar	δ_H Derivado sintético
H ₂	3.8	3.8
H _{3a}	2.9	2.9
H _{3b}	2.8	2.8
H _{5a}	3.1	3.1
H _{5b}	3.1	3.1
H ₆	5.7	5.7
H _{7a}	5.1	5.1
H _{7b}	5.1	5.1

¹Los espectros de RMN¹H del compuesto obtenido por síntesis química y del estándar (SAC-St), se muestran en el apéndice I.

1.2.2 Capacidad antioxidante de la SAC obtenida por síntesis química

1. Anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La SAC atrapó al O₂⁻ de manera dosis dependiente detectado a través de la reducción del NBT (Figura 12). Las dosis de SAC estudiadas no afectaron la producción de ácido úrico (Datos no mostrados).

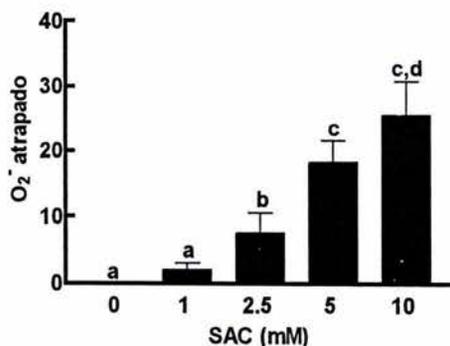


Figura 12. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre la producción de anión superóxido (O₂⁻) generado del sistema xantina/xantina oxidasa. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 3$.



RESULTADOS

La SAC atrapó al H_2O_2 de manera dosis y tiempo dependiente. La capacidad de la SAC para atrapar esta ERO se comparó con la del resveratrol, un conocido antioxidante (Figura 13).

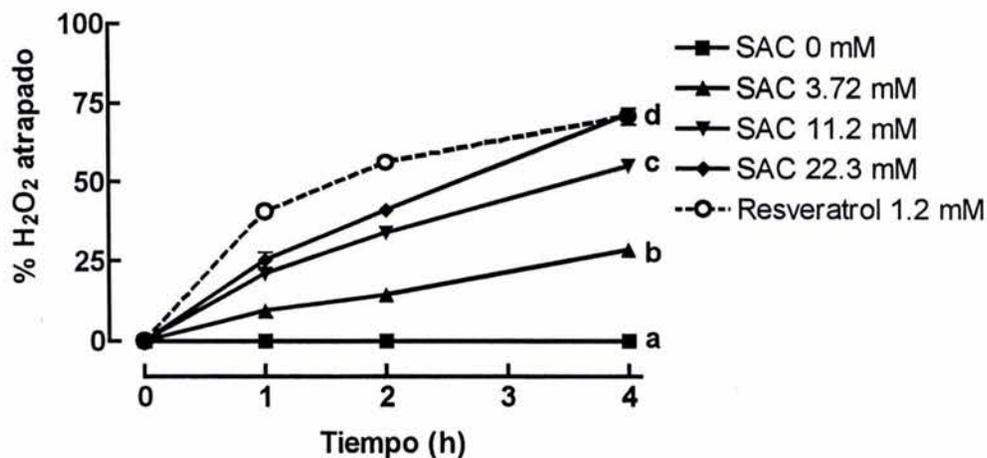


Figura 13. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 3$.

2. Radical hidroxilo (OH) y radical ABTS

En la figura 14 se observa que la SAC atrapa el radical ABTS de manera dosis dependiente. Mientras que concentraciones de SAC de hasta 50 mM no atraparon al OH (Datos no mostrados).

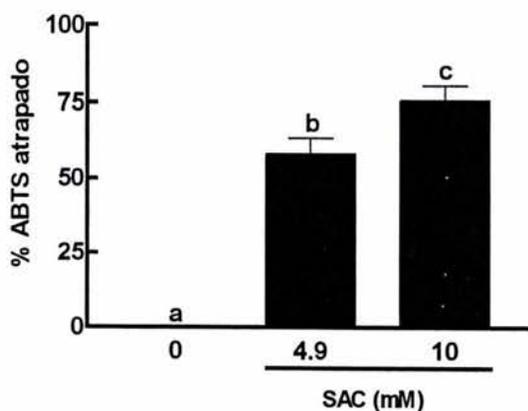


Figura 14. Efecto de la S-alilcisteína (SAC) sobre el radical ABTS. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 3$.



RESULTADOS

1.2.3 Efecto de diferentes dosis de SAC

Se evaluó el efecto de 5 dosis de SAC, sobre el daño renal que se induce cuando se administra GM. Los marcadores que se evaluaron fueron: la actividad de la GPx en el suero (como marcador de función tubular) y el contenido de creatinina en el suero (como marcador de función glomerular).

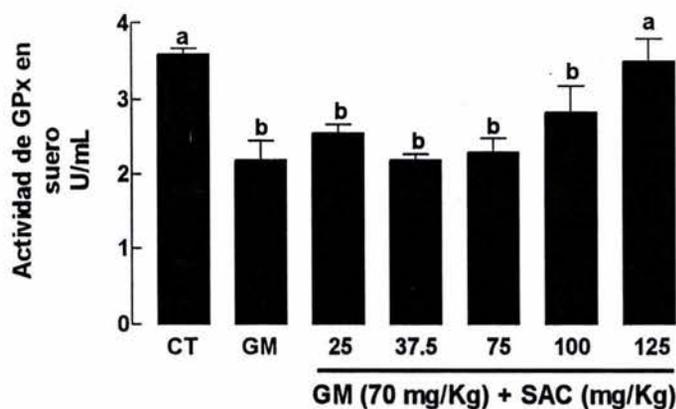


Figura 15. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-allicisteína (SAC) sobre la actividad de la glutación peroxidasa (GPx) en el suero en el día 5. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4$. CT: control.

En la figura 15 se observa que la dosis de 125 mg/Kg de SAC, previno totalmente la disminución de la actividad de la GPx en el suero inducida por la GM.

Así mismo, la dosis de 125 mg/Kg de SAC previno totalmente el incremento en el contenido sérico de creatinina inducido por la GM (Figura 16).

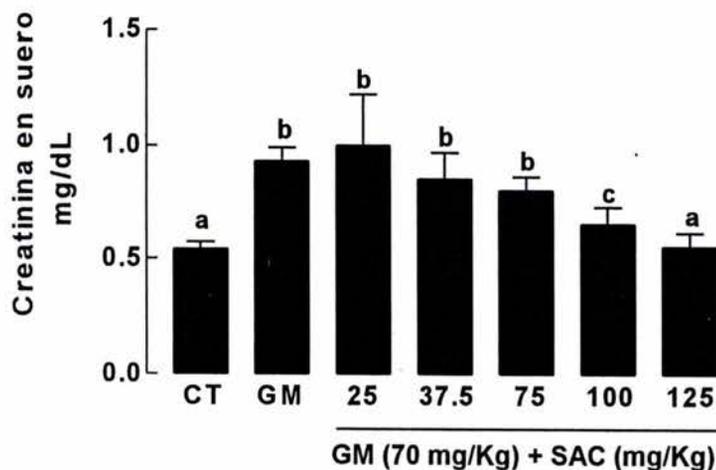


Figura 16. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-allicisteína (SAC) sobre el contenido de creatinina en el suero en el día 5. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4$. CT: control.



RESULTADOS

1.2.4 Peso corporal y volumen urinario

El peso corporal no fue significativamente diferente entre los cuatro grupos de ratas estudiados (CT: 270 ± 11 , GM: 260 ± 14 , SAC: 264 ± 15 , GM+SAC: 263 ± 12 g). Por otro lado, solo en el día 4 del tratamiento, la GM indujo un incremento significativo en el volumen urinario (15.9 ± 3.2 mL) comparado con el grupo control (8.8 ± 1.4 mL), incremento que la SAC no evitó ya que el volumen urinario en el grupo GM+SAC fue de 12 ± 4.3 mL.

1.2.5 Evaluación de la función renal

1. Función tubular

A. Excreción de la NAG y de proteínas en la orina

El tratamiento con GM indujo un incremento significativo en la excreción urinaria de la NAG y de proteínas a partir del día 4 de tratamiento; siendo el día 5 donde se observó el mayor incremento de 5.7 veces para la NAG y de 3.4 veces para proteínas. La SAC previno parcialmente el incremento inducido por la GM en la excreción urinaria de la NAG y de proteínas (grupo GM+SAC) el día 5, efecto que se observó desde el día 4 en ambos parámetros (Figura 17 A y B).

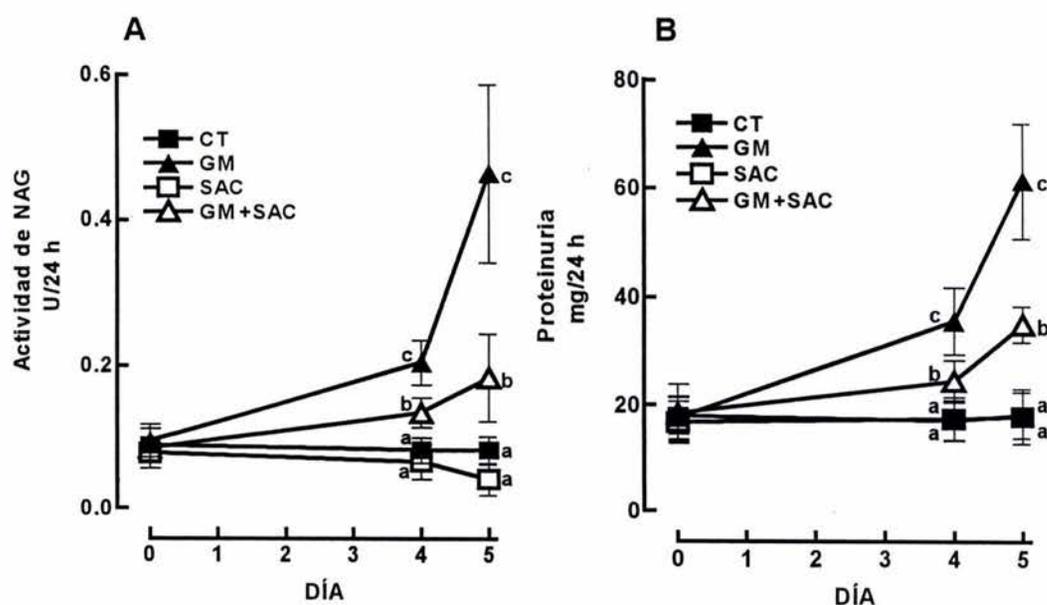


Figura 17. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alilcisteína (SAC) sobre la excreción urinaria de (A) N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) y (B) proteínas en la orina. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 8-10$. CT: control.



RESULTADOS

B. Actividad de la GPx en el suero

La figura 18 muestra que la actividad de la GPx en el suero disminuyó un 48.8% en las ratas tratadas con GM (2.15 ± 0.5 U/mL) comparado con las ratas control (4.2 ± 0.5 U/mL); mientras que en el grupo GM+SAC, la SAC previno parcialmente esta disminución (3.72 ± 0.4 U/mL).

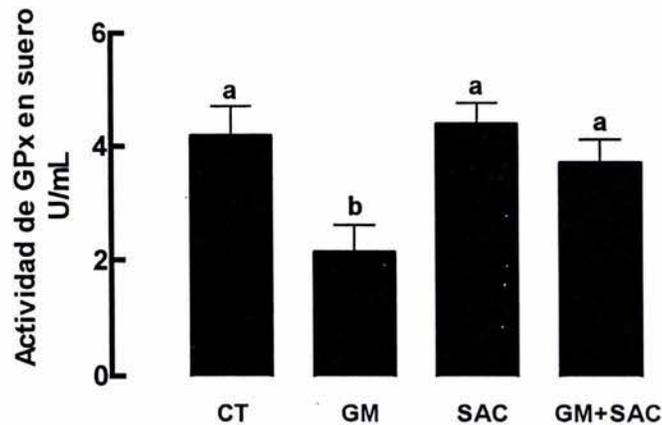


Figura 18. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alilcisteína (SAC) y sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en el suero en el día 5. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4-5$. CT: control.

C. Cuantificación del daño tubular

En las ratas que fueron tratadas con GM se observó vacuolización (cabezas de flecha) y necrosis (*) en las células del túbulo proximal (TP), ya que los glomérulos (G) y los túbulos distales (TD) no mostraron alteración. El daño histológico disminuyó en el grupo GM+SAC, ya que en este grupo solo se observaron vacuolas (Figura 19, panel superior). No se observaron alteraciones estructurales renales en los cortes de las ratas que recibieron SAC (Datos no mostrados).

En la figura 19 A, se muestra que las ratas tratadas con GM presentaron un mayor porcentaje de área tubular dañada, comparado con las ratas CT y con las que recibieron GM y SAC (GM: $98.5 \pm 2\%$ y GM+SAC: $71 \pm 9.5\%$).

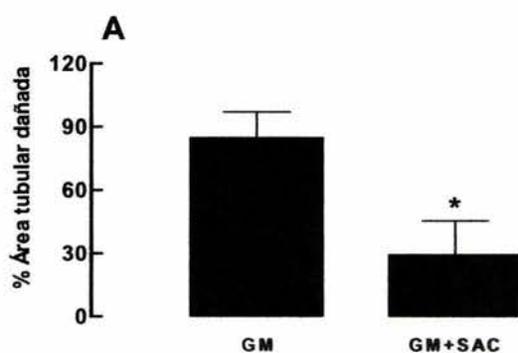
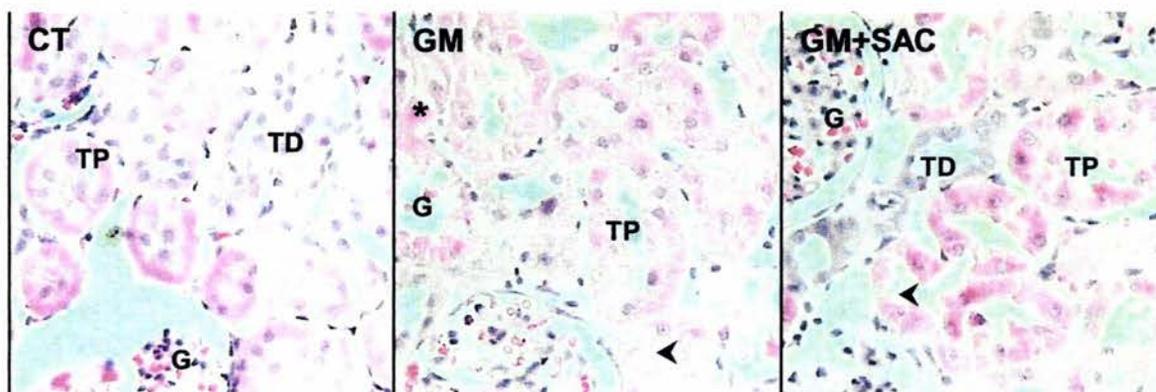


Figura 19. Foto representativa de microscopía de luz, de un corte de corteza renal de ratas: control (CT), tratadas con gentamicina (GM) y tratadas con gentamicina y S-alilcisteína (GM+SAC). En el grupo con GM se observa necrosis (*) en las células de túbulo proximal (TP), mientras que en el grupo GM+SAC se observan vacuolas (cabeza de flecha). G: glómerulo y TD: túbulo distal. 200X. (A) Gráfica que presenta la cuantificación del daño tubular en el día 5. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. *P<0.001 contra el grupo de GM. *n* = 4.

2. Función glomerular

A. Creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN)

En la figura 20 A y B, se observa que la nefrotoxicidad se hizo evidente por el incremento de 1.6 veces en los niveles de creatinina (1.0 ± 0.24 mg/dL) y de BUN (30.98 ± 3.18 mg/dL) en el suero de las ratas tratadas con GM, comparado con las ratas control (creatinina: 0.62 ± 0.09 mg/dL y BUN: 19.63 ± 1.9 mg/dL). En las ratas que recibieron GM y SAC, se previno totalmente el incremento en los niveles de creatinina (0.67 ± 0.16 mg/dL) y de BUN (21 ± 2.1 mg/dL). La SAC sola no tuvo efecto sobre los niveles de creatinina y de BUN.

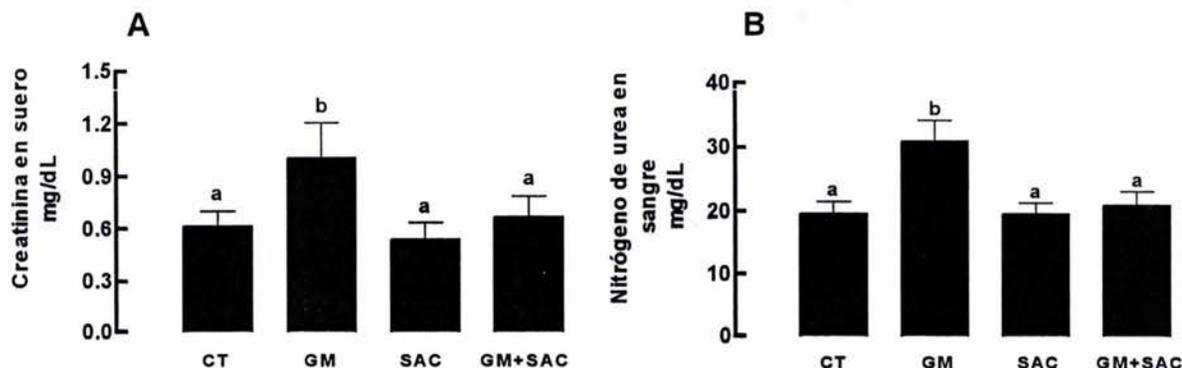


Figura 20. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alicisteína (SAC) sobre (A) la creatinina en suero y (B) el BUN en el día 5. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 9-10$. CT: control.

1.2.6 Evaluación del estrés oxidativo en la corteza renal

1. Contenido de grupos carbonilo en las proteínas

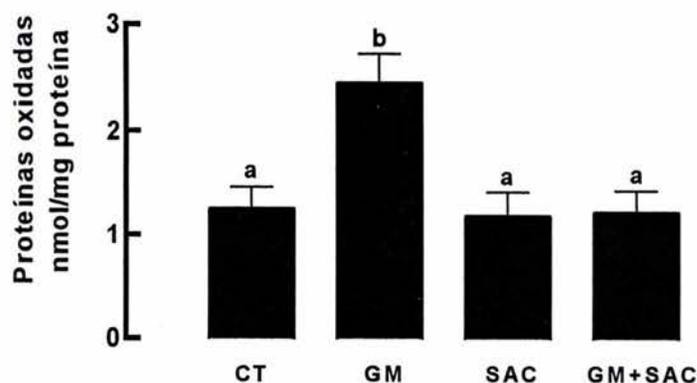


Figura 21. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alicisteína (SAC) sobre los niveles de grupos carbonilo en las proteínas, en corteza renal, en el día 5. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 9-10$. CT: control.

En la figura 21 se muestra que la GM indujo un incremento del 88.5% en el contenido de grupos carbonilo, comparado con el grupo control (CT: 1.30 ± 0.21 y GM: 2.45 ± 0.27 nmol/mg proteína); mientras que el tratamiento de las ratas con SAC previno totalmente el incremento inducido por la GM (GM+SAC: 1.20 ± 0.21 nmol/mg proteína). La SAC no alteró los niveles de proteínas oxidadas (SAC: 1.19 ± 0.23 nmol/mg proteína).



RESULTADOS

2. Contenido de nitrotirosina

En la corteza renal de las ratas tratadas con GM se observa una mayor tinción, debida al mayor nivel de proteínas nitradas, en la células de túbulo proximal, comparado con las ratas del grupo control. La SAC disminuyó notablemente la tinción observada en las ratas tratadas con GM (Figura 22, panel superior). La SAC no tuvo efecto sobre los niveles de nitrotirosina (Figura 22 A).

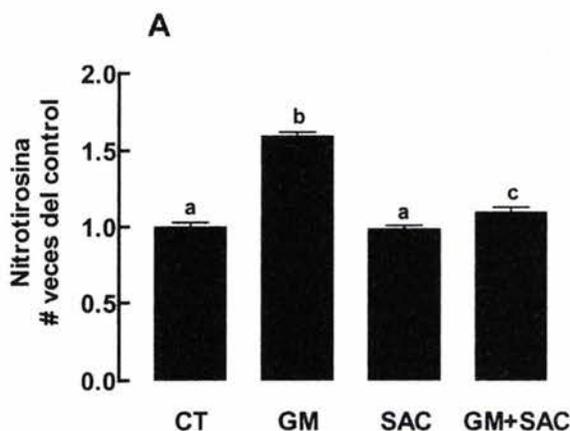
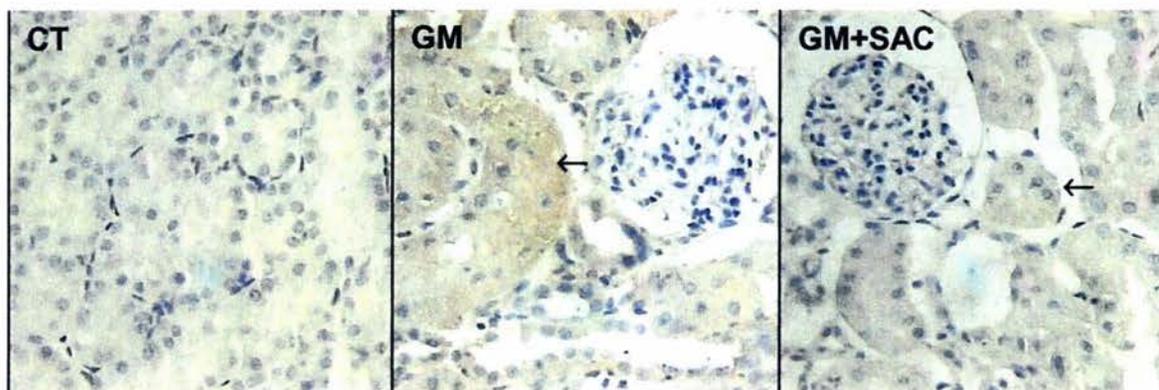


Figura 22. Foto representativa de microscopia de luz, del efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alicisteína (SAC) sobre el contenido de nitrotirosina, en la corteza renal de ratas. La tinción de nitrotirosina se muestra con flechas. 200x. (A) Gráfica que representa la cuantificación de los niveles de nitrotirosina, en la corteza renal, en el día 5. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 5$. CT: control.

3. Contenido de 4-hidroxinonenal (4-HNE)

La figura 23 muestra que comparado con el grupo control, las ratas tratadas con GM presentaron una mayor tinción (debida al mayor nivel de 4-HNE), en las células de túbulo proximal. La SAC disminuyó notablemente la tinción observada en las ratas tratadas con GM. La SAC sola no tuvo efecto sobre los niveles de 4-HNE (Datos no mostrados).



RESULTADOS

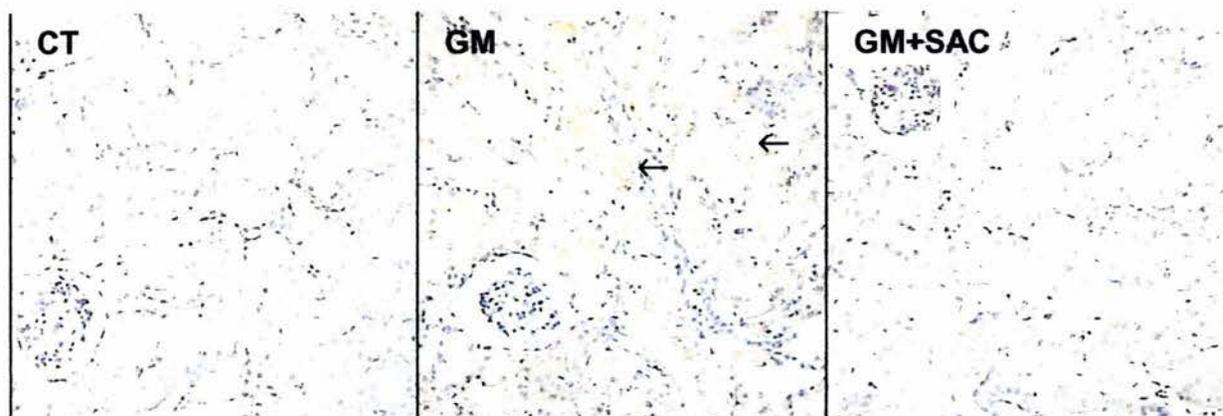


Figura 23. Foto representativa de microscopia de luz, del efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alicisteína (SAC) sobre el contenido de 4-hidroxinonenal, en la corteza renal de ratas en el día 5. La tinción se muestra con flechas. 100x. $n = 5$. CT: control.

1.2.7 Actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal

1. Superóxido dismutasa (SOD)

El tratamiento con GM disminuyó un 16% la actividad de la SOD total de 18.4 ± 0.9 a 15.5 ± 0.6 U/mg proteína (Figura 24 A). Esta disminución se debe a que la actividad de la Mn-SOD disminuyó un 20.9% en las ratas tratadas con GM de 6.7 ± 0.5 a 5.3 ± 0.4 U/mg proteína (Figura 24 B), ya que la actividad de CuZn-SOD no cambió (Datos no mostrados). La SAC previno la disminución en la actividad de la SOD total (18.1 ± 0.6 U/mg proteína), debido a que bloqueó la disminución en la actividad de la Mn-SOD (6.3 ± 0.4 U/mg proteína) (Figura 24 A y B). La SAC sola no tuvo efecto sobre la actividad de la SOD total, la Mn-SOD y la CuZn-SOD.

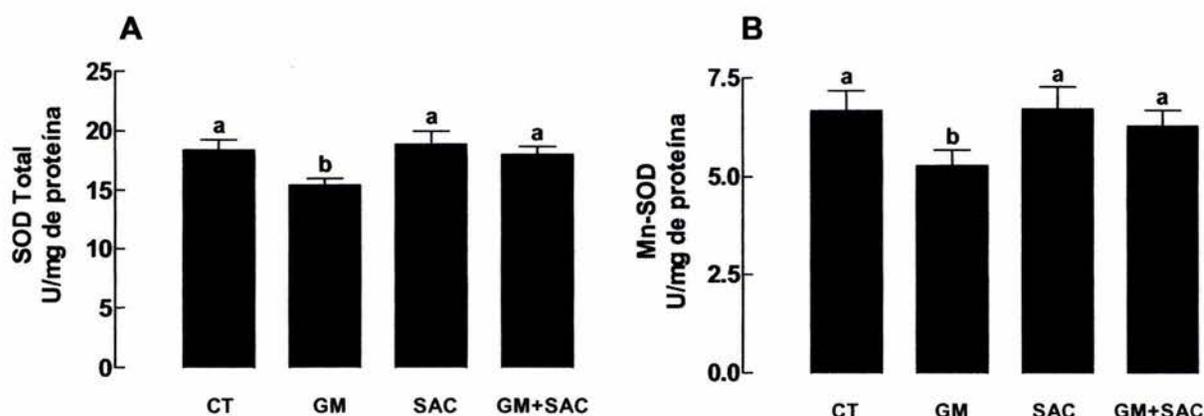


Figura 24. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alicisteína (SAC) sobre la actividad de la (A) superóxido dismutasa total (SOD total) y (B) superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) en la corteza renal en el día 5. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 9-10$. CT: control.



RESULTADOS

2. Catalasa (CAT)

La figura 25 muestra que la GM disminuyó un 51.5% la actividad de la CAT (0.16 ± 0.05 U/mg proteína) en las ratas tratadas con el antibiótico, comparado con el grupo control (0.33 ± 0.05 U/mg proteína). En las ratas que recibieron GM y SAC, éste no previno la disminución de la actividad de la CAT inducida por la GM (0.16 ± 0.04 U/mg proteína). La SAC sola no tuvo efecto sobre la actividad renal de esta enzima.

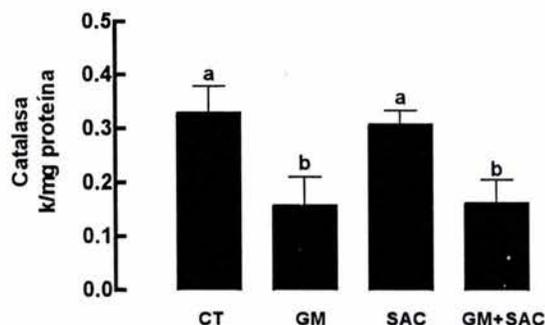


Figura 25. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alilcisteína (SAC) sobre la actividad de catalasa en la corteza renal en el día 5. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 9-10$. CT: control.

3. Glutación peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR)

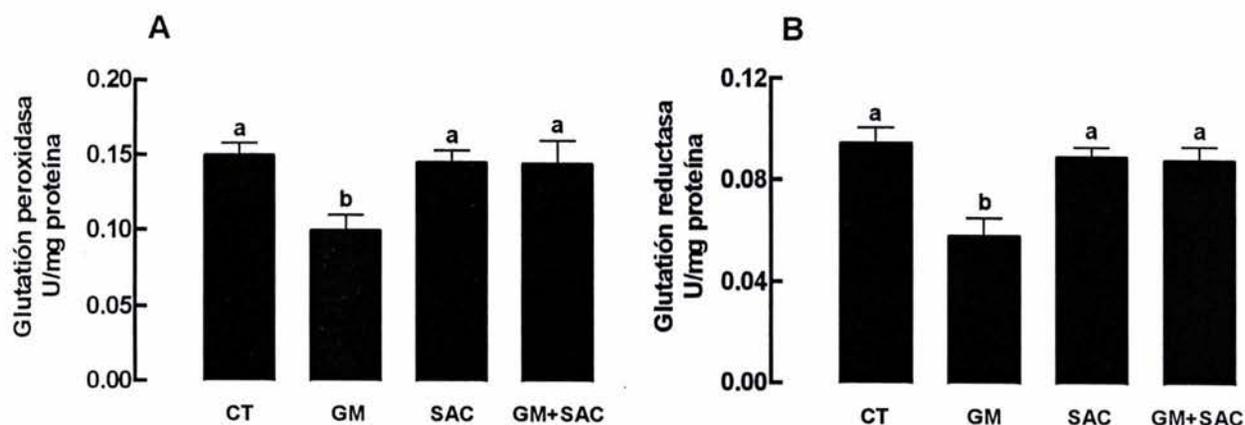


Figura 26. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alilcisteína (SAC) sobre la actividad de la (A) glutatión peroxidasa y (B) glutatión reductasa en la corteza renal en el día 5. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 9-10$. CT: control.



RESULTADOS

La figura 26 A y B muestra que la GM disminuyó un 33.3% la actividad de la GPx (0.1 ± 0.009 U/mg proteína) y un 38.9% la actividad de la GR (0.058 ± 0.007 U/mg proteína), comparado con el grupo control (GPx: 0.15 ± 0.008 U/mg proteína y GR: 0.095 ± 0.006 U/mg proteína). En las ratas que fueron tratadas con GM y con SAC, se previno totalmente la disminución de la actividad de la GPx (0.15 ± 0.01 U/mg proteína) y de la GR (0.09 ± 0.005 U/mg proteína) inducidas por la GM. La SAC sola no tuvo efecto sobre la actividad de GPx y de GR.

1.2.8 Efecto de la SAC sobre la capacidad bactericida de la GM

En la tabla 4 se observa que todas la dosis estudiadas de GM (0.2-2.4 mg/mL), inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, comparado con el grupo control. Por otro lado se observa que la SAC no afectó la capacidad bactericida de la GM, ya que no modificó la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*. La SAC sola no tuvo efecto sobre el crecimiento de esta bacteria.

Tabla 4. Efecto de la gentamicina (GM) y de la S-alilcisteína (SAC) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*¹.

	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (UFC)
CT	3×10^8
GM ($\mu\text{g/mL}$)	
0.2	0
0.4	0
0.8	0
1.2	0
1.6	0
2.0	0
2.4	0
SAC (50 mg/mL)	3×10^8
GM+SAC ²	
0.2	0
0.4	0
0.8	0
1.2	0
1.6	0
2.0	0
2.4	0

¹ Cada uno de los grupos se realizó por duplicado.

² En el grupo de GM+SAC, la concentración que se empleó de SAC fue 50 mg/mL.



RESULTADOS

2. IDENTIFICACIÓN DE LA ALICINA Y LA SAC EN EL AJO POR HPLC

2.1 Identificación de la alicina en un extracto acuoso de ajo (EAA)

Cuando se empleó metanol:H₂O 60:40 como sistema de elución, el estándar de alicina, mostró un solo pico con un tiempo de retención (t_R) de 18.3 min. En el cromatograma obtenido al inyectar el EAA, se observan varios picos con diferentes t_R : 9.6, 13.9, 18.3 y 31.9 min (Figura 27, panel superior).

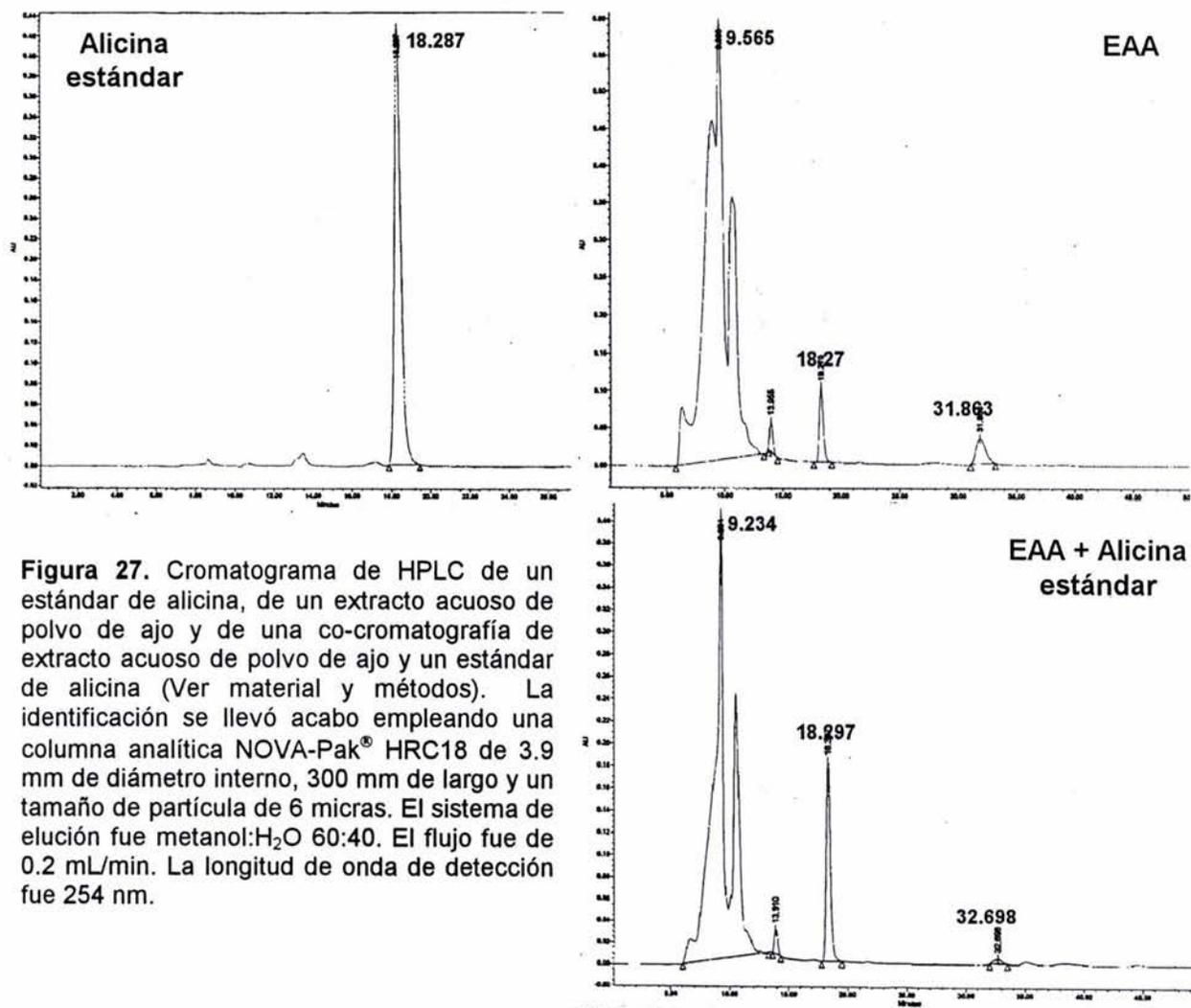


Figura 27. Cromatograma de HPLC de un estándar de alicina, de un extracto acuoso de polvo de ajo y de una co-cromatografía de extracto acuoso de polvo de ajo y un estándar de alicina (Ver material y métodos). La identificación se llevó a cabo empleando una columna analítica NOVA-Pak[®] HRC18 de 3.9 mm de diámetro interno, 300 mm de largo y un tamaño de partícula de 6 micras. El sistema de elución fue metanol:H₂O 60:40. El flujo fue de 0.2 mL/min. La longitud de onda de detección fue 254 nm.

En la figura 27 panel inferior, se muestra el cromatograma obtenido a partir de la coelución del EAA y del estándar de alicina. En este caso, también pueden observarse varios picos con diferentes t_R : 9.2, 13.91, 18.3 y 32.7 min; y se observa que el pico de 18.34 min, aumentó en unidades arbitrarias con respecto a lo que se observó en el cromatograma del EAA solo.



RESULTADOS

Por otro lado, cuando se emplea acetonitrilo:metanol:H₂O 50:41:9 como sistema de elución, el estándar de alicina, muestra un solo pico con un t_R de 14.8 min. El cromatograma obtenido al inyectar el EAA muestra dos picos con diferentes t_R 8.8 y 14.6 min (Figura 28, panel superior).

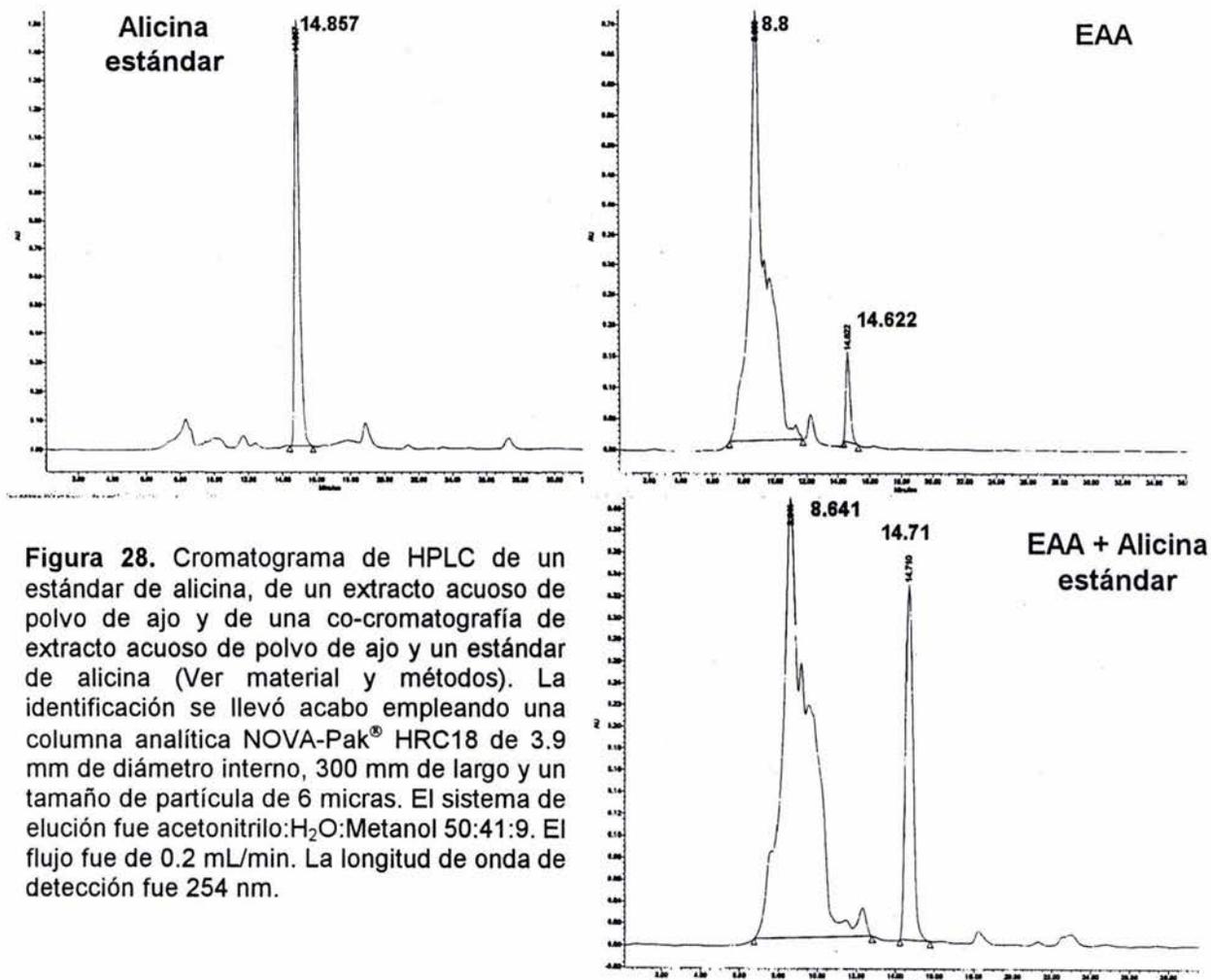


Figura 28. Cromatograma de HPLC de un estándar de alicina, de un extracto acuoso de polvo de ajo y de una co-cromatografía de extracto acuoso de polvo de ajo y un estándar de alicina (Ver material y métodos). La identificación se llevó a cabo empleando una columna analítica NOVA-Pak[®] HRC18 de 3.9 mm de diámetro interno, 300 mm de largo y un tamaño de partícula de 6 micras. El sistema de elución fue acetonitrilo:H₂O:Metanol 50:41:9. El flujo fue de 0.2 mL/min. La longitud de onda de detección fue 254 nm.

En la figura 28 panel inferior, se muestra el cromatograma obtenido a partir de la coelución del EAA y del estándar de alicina. En este caso, también se observan dos picos con t_R de 8.6 y 14.7 min. Y se observa que el pico de 14.7 min aumentó en unidades arbitrarias con respecto a lo que se observó en el cromatograma del EAA solo.



RESULTADOS

2.2 Identificación de la SAC en el EAE

Como blanco se inyectó la solución PITC; la cual mostró varios picos, con t_R de 9.5, 10.2, 16.8 y 18.7 min. Los picos observados en estos tiempos desaparecieron en los cromatogramas siguientes (Figura 29).

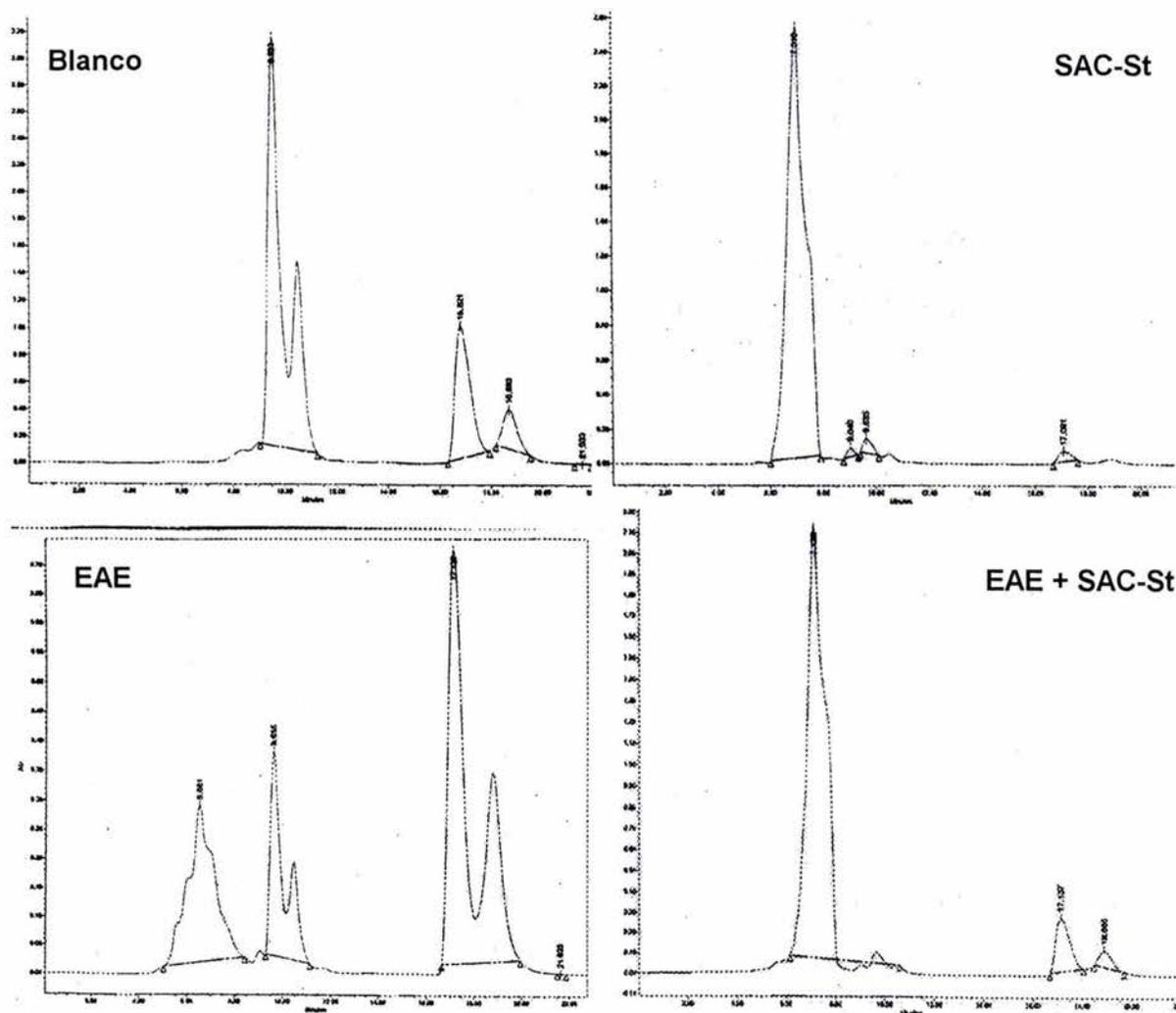


Figura 29. Cromatograma de HPLC del blanco, del estándar de SAC, del EAE y de la coelución del EAE y de la SAC (ver material y métodos). La identificación se llevó a cabo empleando una columna preparativa NOVA-Pak[®] HRC18 de 3.9 mm de diámetro interno, 300 mm de largo y un tamaño de partícula de 6 micras. El sistema de elución empleado fue acetonitrilo:H₂O 70:30. El flujo fue de 0.3 mL/min. La longitud de onda de detección fue 254 nm.

En la figura 29 se observa que la SAC-St, muestra un pico máximo, con un t_R de 7.0 min; mientras que el EAE, muestra varios picos con diferentes t_R 6.5, 9.6, 17.1 y 18.4 min. En el cromatograma obtenido de la coelución del EAE y la SAC-St, se observa un pico máximo con un t_R de 7.1 min, similar al observado en el cromatograma de la SAC-St (Figura 29).



RESULTADOS

3. Estudios *in vitro*

3.1 Estudio dosis-respuesta con GM

Primero se realizó un experimento para elegir la dosis de GM donde se encontrará el 50% de la muerte celular, para ello se realizó un estudio con diferentes concentraciones de GM por un tiempo de 3 días, tiempo en que algunos estudios se han realizado. Los resultados muestran que la viabilidad celular disminuyó al aumentar la dosis de GM, obteniéndose la dosis letal media (DL₅₀) con la concentración de 8 mM (Figura 30).

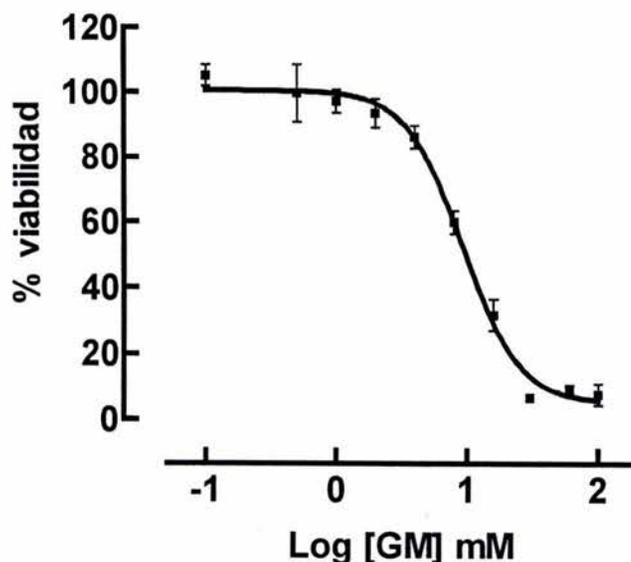


Figura 30. Efecto de la gentamicina (GM) sobre la viabilidad de las células LLC-PK₁ durante 3 días. La viabilidad celular se evaluó mediante una tinción con cristal violeta. Las dosis de GM empleadas fueron: 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 y 100 mM. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. $n = 4$.

Se eligió un tiempo de 3 días y una dosis de 8 mM de GM para realizar los experimentos siguientes, donde se evaluó el efecto del EAA, el EAE, así como el de algunos compuestos organosulfurados del ajo como la alina, la alicina y la SAC, sobre la muerte celular.

3.2 Efecto del EAA, el EAE, la alina, la alicina y la SAC

En la figura 31 A y B se observa que la viabilidad celular disminuyó en el grupo tratado con GM durante 3 días, comparada con el grupo control. El tratamiento con EAA y EAE (a las dosis estudiadas), no previno la muerte celular inducida por la GM.



RESULTADOS

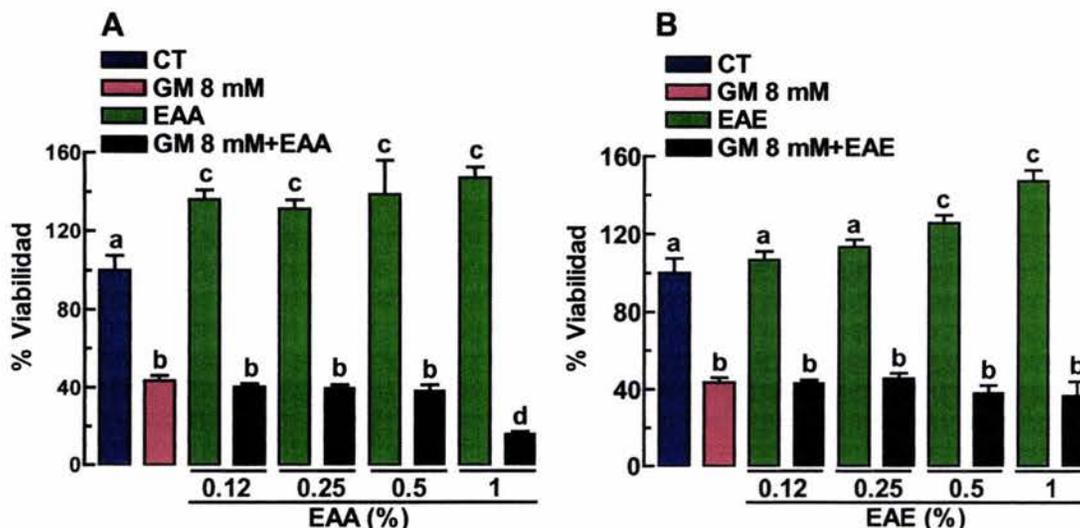


Figura 31. Efecto del (A) extracto acuoso de polvo de ajo (EAA) y del (B) extracto de ajo envejecido (EAE), sobre la viabilidad de las células LLC-PK₁, tratadas con gentamicina (GM) durante 3 días. La viabilidad celular se evaluó mediante una tinción con cristal violeta. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4$. CT: control.

Por otro lado, el tratamiento con alicina y con SAC (a las dosis estudiadas), tampoco previno la muerte celular inducida por la GM (Figura 32 B y C), incluso la alicina a concentraciones de 300 μM o más es tóxica para las células. Mientras que con la alina se observó una ligera pero significativa prevención en la muerte celular inducida por la GM, con dos de las dosis empleadas de este compuesto (Figura 32 A).

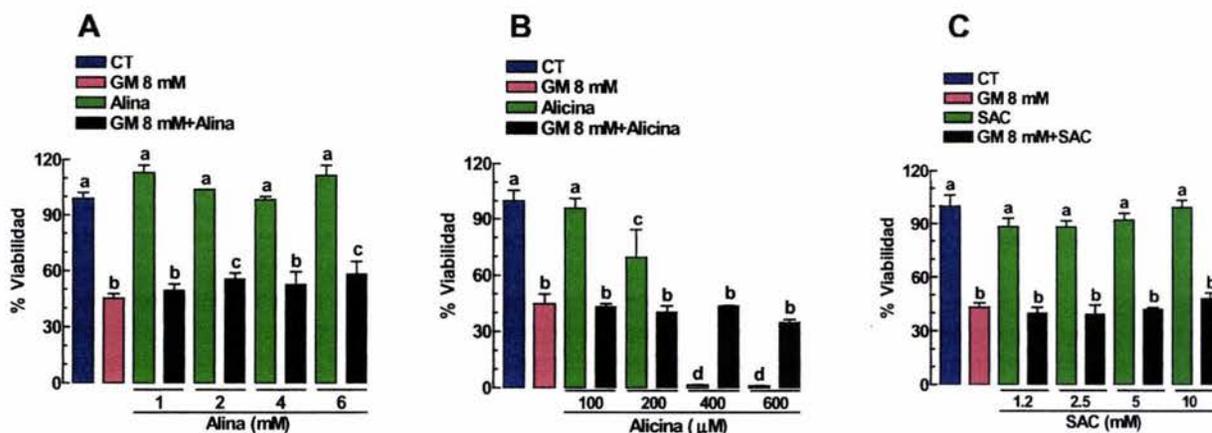


Figura 32. Efecto de (A) alina, (B) alicina y (C) S-alilcisteína (SAC), sobre la viabilidad de las células LLC-PK₁, tratadas con gentamicina (GM) durante 3 días. La viabilidad celular se evaluó mediante una tinción con cristal violeta. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4$. CT: control.



RESULTADOS

3.3 Efecto del EAA, el EAE, la alina, la SAC y la NAC administrados 12 h antes de la GM

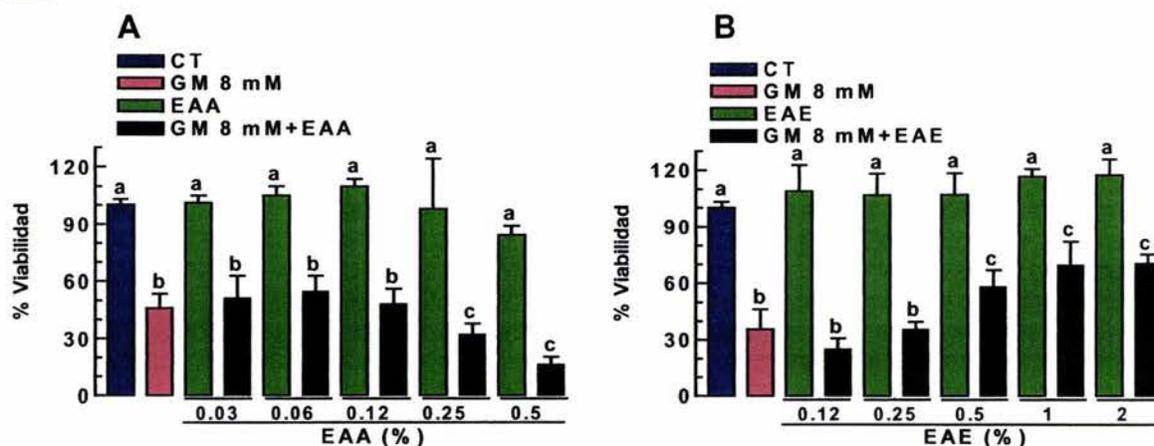


Figura 33. Efecto del (A) extracto acuoso de ajo (EAA) y (B) extracto de ajo envejecido (EAE), administrados 12 h antes de la gentamicina (GM), sobre la viabilidad de las células LLC-PK₁, tratadas con GM durante 3 días. La viabilidad celular se evaluó mediante una tinción con cristal violeta. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4$. CT: control.

La figura 33 A muestra que la preincubación (12 h antes de la administración de GM) de las células LLC-PK₁ con EAA, no previene la muerte celular inducida por la GM, con las concentraciones empleadas de este extracto. Mientras que el EAE al 1 y 2%, previenen parcialmente la muerte celular inducida por la GM (Figura 33 B). El tratamiento con alina, SAC y NAC (a las dosis estudiadas), no evitó la muerte celular inducida por la GM (Figura 34 A, B y C).

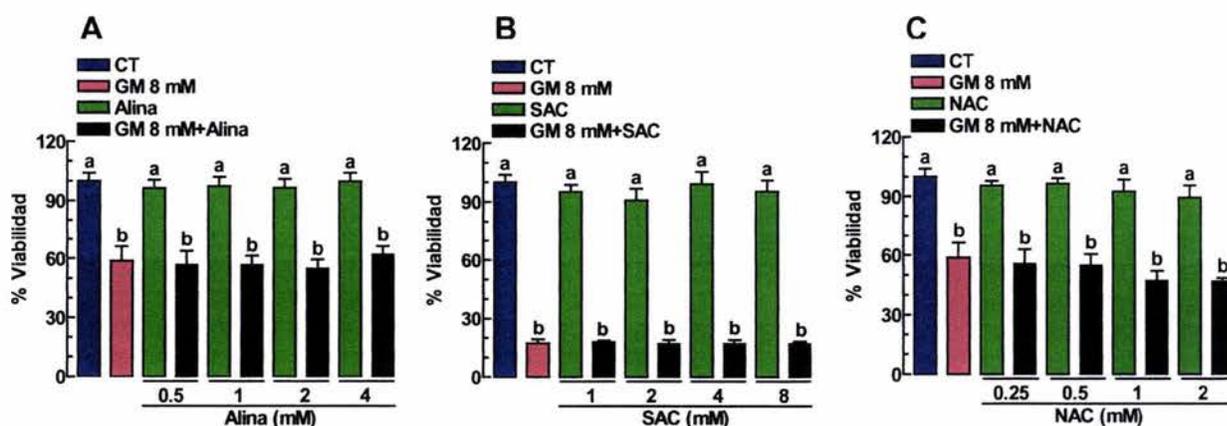


Figura 34. Efecto de (A) alina, (B) S-alilcisteína (SAC) y (C) N-acetilcisteína (NAC), administrados 12 h antes de la gentamicina (GM), sobre la viabilidad de las células LLC-PK₁, tratadas con GM durante 3 días. La viabilidad celular se evaluó mediante una tinción con cristal violeta. Los datos se presentan como la media±desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. $n = 4$. CT: control.



IX. DISCUSIÓN

A pesar del potencial efecto nefrotóxico de la gentamicina (GM), éste antibiótico aún se considera un agente importante en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas (Edson & Terrell, 1999). Esto se debe a: 1) que es un antibiótico de amplio espectro bactericida; 2) que es efectivo contra microorganismos resistentes a antibióticos β -lactámicos, lo cual es importante debido al elevado número de casos de resistencia que se presenta en los hospitales, contra esta familia de antibióticos y 3) su bajo costo, ya que a pesar de que existen nuevos agentes, que pueden emplearse en lugar de la GM, como las cefalosporinas de tercera generación, estas son 136% más caras que la GM. Una caja de GM (Garamicina[®]), con 5 ampollitas de 160 mg/2 mL de Schering-Plough, cuesta en promedio 250 pesos; mientras que una caja de cefotaxima (Claforan[®]), con 1 ampollita de 500 mg/2 mL de Hoechst Marion Roussel, cuesta en promedio 118 pesos (5 ampollitas 590 pesos) en las farmacias del país. Estos datos indican que un tratamiento de 7 días con GM, costaría alrededor de 350 pesos; mientras que con cefotaxima (cefalosporina de tercera generación), costaría 826 pesos.

El mecanismo preciso por el cual la GM induce el daño renal aún no está bien establecido; sin embargo, varios agentes que atrapan o interfieren con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) disminuyen la nefrotoxicidad (Abdel-Naim *et al.*, 1999; Ademuyiwa *et al.*, 1990; Ali, 2002; Ali & Bashir, 1996; Al-Majed *et al.*, 2002; Ateşşahin *et al.*, 2003; Cuzzocrea *et al.*, 2002; Erdem *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Mazzon *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2002; Naidu *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 1994; Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2003a; 2003b; 2000; Sener *et al.*, 2002; Varalakshmi *et al.*, 2003; Walker & Shah, 1988). En un trabajo previo de este laboratorio (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000), se encontró que la insuficiencia renal aguda (IRA) inducida por la GM disminuye parcialmente en las ratas que se alimentaron con una dieta enriquecida con polvo de ajo al 2%. Sin embargo, el polvo de ajo es una presentación poco práctica para emplearla con fines terapéuticos en humanos, debido a que una persona (de 70 Kg), debería consumir 78.5 g de polvo de ajo al día, para reproducir las mismas condiciones experimentales que en ese trabajo y clínicamente ésta cantidad de polvo de ajo sería poco práctica. Además, el olor característico del ajo puede ser una limitante para su empleo generalizado en humanos.

Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del extracto de ajo envejecido (EAE), sobre la IRA inducida por la GM. El EAE es una presentación del ajo que no posee el olor



característico de otras presentaciones del ajo. Esto se debe, a que durante el proceso de envejecimiento (el cual dura más de 20 meses), los compuestos inestables y olorosos del ajo fresco, se convierten en compuestos más estables y con olor menos intenso (Amagase *et al.*, 2001) como la S-alilcisteína (SAC) y la S-alilmercaptocisteína (SAMC). Además, en la literatura hay estudios que evalúan las propiedades antioxidantes del EAE (Borek, 2001; Dillon *et al.*, 2003; 2002; Ide & Lau, 1999a; Ide *et al.*, 1997; 1996; Kim *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 1994; Numagami *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1994).

El EAE previno parcialmente el incremento inducido por la GM, en los niveles de creatinina y de BUN en el suero (ambos marcadores de la función glomerular, Figura 8). Estos cambios no pueden atribuirse a una alteración estructural del glomérulo, debido a que esta sección de la nefrona se encuentra normal en las ratas que son tratadas con este antibiótico (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha encontrado que el tratamiento con GM incrementa la producción de H_2O_2 (Guidet & Shah, 1989; Walker & Shah, 1987; Yang *et al.*, 1995) y de O_2^- (Cuzzocrea *et al.*, 2002) y estas ERO's inducen la contracción de las células mesangiales del glomérulo (Duque *et al.*, 1992; Martínez-Salgado *et al.*, 2002). La contracción de estas células, altera el área de la superficie de filtración y el coeficiente de ultrafiltración glomerular, factores que llevan a una disminución de la velocidad de filtración glomerular. Además, la disminución en la actividad de la Mn-SOD (Tabla 1) encontrada en este estudio, favorecería el incremento en los niveles de O_2^- . Esto es importante, debido a que este radical puede reaccionar con el óxido nítrico (ON, un vasodilatador) para formar peroxinitrito, una especie reactiva de nitrógeno citotóxica. Esto es apoyado por el incremento encontrado en los niveles de nitrotirosina en el riñón (Figura 10). La inactivación del ON por el O_2^- , llevaría a la disminución de los niveles del vasodilatador; lo que finalmente, también podría llevar a la disminución de la velocidad de filtración glomerular (Rivas-Cabañero *et al.*, 1997; 1995). Estos datos, indican que el H_2O_2 y el O_2^- , podrían estar involucrados en la disminución de la velocidad de filtración glomerular y que el efecto protector del EAE podría estar relacionado con su capacidad para atrapar H_2O_2 (Figura 3; Borek, 2001; Kim *et al.*, 2001) y O_2^- (Figura 1 y 2; Borek, 2001; Ide & Lau, 1999a) y/o con su capacidad para prevenir la disminución en la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Tabla 1). Adicionalmente, se ha encontrado que el EAE incrementa la producción de ON (Moriyama *et al.*, 2002), lo cual también podría ayudar a prevenir la disminución de la velocidad de filtración glomerular.



Debido a que la GM se acumula en las células del túbulo proximal (Silverblatt & Kueh, 1979), la función tubular se evaluó, midiendo la actividad de la GPx en el suero, la excreción urinaria de la enzima lisosomal NAG y de las proteínas totales en la orina. Las ratas que fueron tratadas con GM, mostraron un incremento en la excreción urinaria de la NAG y de las proteínas totales (Figura 5), así como una disminución en la actividad de la GPx en el suero (Figura 6). Dichas alteraciones podrían estar asociadas con la necrosis que sufren las células del túbulo proximal, como lo demuestran las imágenes de histología, ya que los túbulos distales y los glomérulos no muestran alteraciones estructurales (Figura 7). Se ha sugerido que el estrés oxidativo puede estar involucrado en la inducción del daño tubular (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Mazzon *et al.*, 2001) y en este estudio, se encontró un incremento en el contenido de grupos carbonilo en las proteínas y en los niveles de nitrotirosina (Figuras 9 y 10), ambos marcadores de estrés oxidativo. El efecto parcialmente protector del EAE sobre los parámetros tubulares podría estar asociado, al menos en parte, con su capacidad para disminuir la necrosis tubular. Esto podría estar asociado con sus propiedades antioxidantes (ya que disminuye el contenido de grupos carbonilo y de nitrotirosina en las proteínas). Otra posibilidad es que el EAE disminuya el contenido de GM en las células del túbulo proximal; sin embargo, el tratamiento con EAE no altera el contenido de este antibiótico en la corteza renal (Figura 11).

Por último, el daño que se observa en las ratas tratadas con GM, también puede deberse a que este antibiótico induce una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes: Mn-SOD, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Tabla 1). La disminución en la actividad de estas enzimas, podría estar asociado con un aumento en la producción de ERO's; ya que se sabe que: 1) el peroxinitrito puede inactivar a la GPx (Padmaja *et al.*, 1998) y la Mn-SOD (MacMillan-Crow & Thompson, 1999) y 2) el O_2^- puede inactivar a la GPx (Blum & Fridovich, 1985; Rister & Baehner, 1976) y a la CAT (Rister & Baehner, 1976).

La inactivación de las enzimas antioxidantes por las ERO's o por las especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito, puede deberse a la oxidación o a la nitración de residuos específicos que formen parte del centro catalítico de la enzima. Por ejemplo, la GPx contiene un aminoácido raro, la selenocisteína (Sec45), la cual es esencial para la actividad de enzima y es más reactiva que los grupos tiol. En este contexto, se ha propuesto que la inactivación de la GPx por el peroxinitrito se debe a la modificación de la Sec45, la cual puede ocurrir a través de 2 vías: 1) nitración del selenio o bien 2) la formación de un puente Se-S, entre la Sec45 y la



Cys95, lo que daría como consecuencia la inactivación de la enzima (Asahi *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha observado que la inactivación de la Mn-SOD por el peroxinitrito, puede ocurrir a nivel de residuos de tirosina independientes del sitio activo de la enzima. La modificación de los residuos de tirosina, incluye no solo la nitración de residuos críticos para la actividad catalítica, sino también la oxidación y la subsecuente formación de residuos de ditirosina (McMillan-Crow & Thompson, 1999). Además, en este estudio la disminución de la actividad de la Mn-SOD con GM, se debe a un efecto directo de las ERO's sobre la enzima, ya que la cantidad de ésta no cambió. En el caso de la CAT, la GM ejerce un efecto a nivel de la transcripción, ya que además de la inactivación directa de la enzima por las ERO's, la disminución en la actividad de ésta, es una consecuencia de la disminución en la cantidad de proteína (Tabla 2) y en su ARNm (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000). El EAE previno totalmente la disminución de la actividad de la Mn-SOD, la GPx y la GR; debido probablemente, a su capacidad de atrapar O_2^- (Figuras 1 y 2; Borek, 2001; Kim *et al.*, 2001). La disminución de los niveles de O_2^- , llevarían a la disminución de los niveles de peroxinitrito, lo cual estaría apoyado por la disminución de los niveles de nitrotirosina (Figura 10). El EAE no fue capaz de prevenir la disminución de la actividad de la CAT inducida por la GM; probablemente porque esta disminución no se debe sólo a la inactivación de la CAT, sino que se debe a una disminución en la cantidad de la proteína y del ARNm.

Los resultados anteriores indican que el EAE disminuye parcialmente la insuficiencia renal aguda inducida por la GM debido, quizás, a sus propiedades antioxidantes. Aunque no se evaluaron cantidades mayores de EAE para ver si el efecto observado aumentaba, si se puede concluir que el EAE, es una presentación que podría tener aplicaciones terapéuticas futuras.

Por otro lado, otros mecanismos podrían estar participando en el efecto protector del EAE, ya que este es una mezcla compleja de compuestos (Lawson, 1998). Dentro de estos mecanismos potenciales, está el hecho de que el EAE tiene la capacidad de aumentar el contenido de glutatión (Wang *et al.*, 1999); además, de que puede quelar metales (Dillon *et al.*, 2003) como el hierro; el cual podría estar involucrado en el daño renal inducido por la GM como ya ha sido propuesto (Ueda *et al.*, 1993).

El efecto protector de EAE, sugiere que esta presentación contiene compuestos, que podrían disminuir la IRA inducida por la GM. En otros modelos se ha postulado que la SAC (Borek,



2001; Kim *et al.*, 2001; Numagami & Ohnishi, 2001; Yamasaki *et al.*, 1994), la SAMC (Borek, 2001) y la alina (Kourounakis & Rekka, 1991) podrían ser los compuestos responsables de los efectos encontrados con el EAE.

La SAC es el compuesto más abundante del EAE (6.1 mg/g de extracto seco), que se emplea para estandarizar extractos de ajo envejecido comerciales (Lawson, 1996). Además, la SAC presenta algunas características que sugieren evaluar su efecto en la IRA inducida por la GM. Algunas de estas características son: 1) es soluble en agua (Kodera *et al.*, 2002), 2) es un compuesto estable que permanece inalterado, hasta por 2 años (Lawson, 1996), 3) es inodoro (Kodera *et al.*, 2002), 4) es menos tóxico que otros compuestos del ajo (Amagase *et al.*, 2001), 5) su farmacocinética está bien establecida (Nagae *et al.*, 1994), 6) muestra alta biodisponibilidad, ya que se absorbe fácilmente por tracto gastrointestinal y puede ser detectado en el plasma y en hígado y en riñón (Nagae *et al.*, 1994) y 7) su síntesis química es sencilla (Lawson *et al.*, 1991).

En este trabajo no se cuantificó el contenido de SAC en el EAE; sin embargo, el compuesto se identificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en el extracto (Figura 29). Debido a esto y a que la SAC no se puede adquirir comercialmente, se realizó su síntesis química. El espectro de RMN¹H del producto obtenido por síntesis química fue idéntico al de la SAC-St, corroborándose así su estructura (Apéndice I). Además, se confirmó su capacidad de atrapar O₂⁻ (Figura 12; Kim *et al.*, 2001) y H₂O₂ (Figura 13; Ide & Lau, 2001).

Cuando se evaluó el efecto de la SAC sobre la IRA inducida por la GM, se encontraron resultados similares a los encontrados con el EAE. El tratamiento con SAC previno totalmente el incremento en los niveles de la creatinina y del BUN en el suero de las ratas tratadas con GM (Figura 20), parámetros que han sido empleados como marcadores de disfunción renal glomerular (Schor *et al.*, 1981). Como ya se mencionó, el incremento en estos parámetros podría estar asociado con el aumento en la producción de O₂⁻ (Guidet & Shah, 1989; Yang *et al.*, 1995) y de H₂O₂ (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1995), ya que estos pueden inducir una disminución en la velocidad de filtración glomerular, vía la inducción de la contracción de las células mesangiales (Duque *et al.*, 1992; Martínez-Salgado *et al.*, 2002). Además, el aumento en los niveles de O₂⁻ (debido a la disminución de la actividad de la Mn-SOD, figura 24), podría llevar a una disminución de los niveles de ON, un vasodilatador (Cuzzocrea *et al.*, 2002),



lo que también podría contribuir en la disminución de la velocidad de filtración glomerular (Rivas-Cabañero *et al.*, 1997; 1995). El efecto protector de la SAC, podría estar asociado con su capacidad para atrapar O_2^- (Figura 12; Kim *et al.*, 2001) y H_2O_2 (Figura 13; Ide & Lau, 2001) y/o con su capacidad para prevenir la disminución en la actividad de la Mn-SOD (Figura 24). Además de esto, se ha encontrado que la SAC regula diferencialmente la producción de ON, ya que inhibe la expresión de la sintasa de ON de macrófagos, mientras que aumenta la producción de este vasodilatador, en las células endoteliales (Kim *et al.*, 2001); lo cual podría contribuir en la restauración de la velocidad de filtración glomerular en los animales que fueron tratados con GM y que recibieron SAC.

Por otro lado, se encontró que el tratamiento con SAC disminuyó significativamente el incremento en la excreción urinaria de la NAG y de las proteínas (Figura 17) y previno la disminución en la actividad de la GPx en el suero (Figura 18), inducidos por la GM. Estos cambios podrían estar asociados con la necrosis de las células del túbulo proximal (Figura 19), ya que éste es el sitio primario de acumulación de la GM (Silverblatt & Kueh, 1979). Se ha sugerido que varios mecanismos están involucrados en la generación del daño tubular. Uno de estos mecanismos, involucra al estrés oxidativo (Cuzzocrea *et al.*, 2002; Guidet & Shah, 1989; Walker *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1995). En este trabajo, el estrés oxidativo fue evidente por el incremento en el contenido de: 1) los grupos carbonilo en las proteínas (Figura 21), nitrotirosina (Figura 22) y 4-hidroxinonenal (Figura 23). Además, se sabe que el aumento en los niveles de ERO's, induce citotoxicidad, debida a la acción concertada de especies reactivas derivadas de oxígeno (Cuzzocrea *et al.*, 2002) y de nitrógeno (Augusto *et al.*, 2002). Tomando en cuenta lo anterior, el efecto protector de la SAC sobre los parámetros tubulares, podría estar asociado con la disminución: 1) del estrés oxidativo (Figuras 21-23) y 2) de la necrosis tubular (Figura 19), en las ratas que fueron tratadas con GM. Esto sugiere que las ERO's podrían estar involucradas en las alteraciones tubulares inducidas por este antibiótico y que el efecto protector de la SAC, podría estar asociado con sus propiedades antioxidantes (Geng *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2001; Ide & Lau, 2001; 1999b; 1997; Ide *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 1994; Mostafa *et al.*, 2000; Numagami & Ohnishi, 2001; Numagami *et al.*, 1996; Yamasaki *et al.*, 1994; Figuras 12 y 13).

El tratamiento con GM indujo una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes: Mn-SOD (Figura 24), CAT (Figura 25), GPx y GR (Figura 26) en la corteza renal, lo cual podría



estar asociado con un aumento en la producción de ERO's, como el O_2^- , el peroxinitrito y el H_2O_2 (Blum & Fridovich, 1985; MacMillan-Crow & Thompson, 1999; Padmaja *et al.*, 1998; Rister & Baehner, 1976). Además, la disminución en la actividad de CAT en las ratas tratadas con GM, podría ser secundaria a la disminución en la cantidad de proteína y de ARNm de ésta proteína (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000) como ya se discutió previamente. La SAC previno totalmente la disminución de la actividad de GPx, GR y Mn-SOD, probablemente debido a sus propiedades antioxidantes, aunque esto aún debe comprobarse.

Estos resultados indican que el incremento en el estrés oxidativo y la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes (Mn-SOD, CAT, GPx y GR), podrían ser dos factores involucrados en la secuencia de eventos que llevan al daño renal inducido por la GM. Esto es apoyado por el hecho de que la SAC, mostró un efecto totalmente protector a nivel de: 1) los parámetros glomerulares, 2) los parámetros de estrés oxidativo y 3) la actividad de algunas enzimas antioxidantes; mientras que, sobre los parámetros tubulares y sobre la necrosis tubular, solo ejerció un efecto parcialmente protector, lo que indica que otros mecanismos están involucrados en la inducción del daño por este antibiótico. Además, estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo, no es el evento primario en la secuencia de eventos que llevan a la necrosis de las células del túbulo proximal. Lo que sugeriría que el estrés oxidativo no es una causa sino una consecuencia del daño renal que se induce con la GM.

El efecto protector obtenido con la SAC fue mayor que el obtenido con el EAE. La SAC previno totalmente las alteraciones glomerulares, mientras que el EAE sólo lo hizo parcialmente. Además, en este trabajo la SAC se administró 24 h antes del tratamiento con GM, intervalo de tiempo que es menor al empleado con el EAE (48 h) y que es más compatible, para ser usado, en la práctica clínica. Aunque claro, lo ideal sería la administración conjunta de la SAC con la GM.

Estos resultados apoyan al menos en parte, la hipótesis de que la SAC es uno de los principios activos responsable del efecto protector del EAE, sobre la insuficiencia renal inducida por la GM.

Por último, la SAC al ser un compuesto polar, estable y de alta biodisponibilidad podría ser el candidato de elección para una posible estrategia con fines terapéuticos en humanos; ya que la



GM al ser un antibiótico polar, podría administrarse de manera conjunta con la SAC. Además, la SAC no afecta la capacidad bactericida de la GM, al menos *in vitro* (Tabla 4), lo que incrementaría la posibilidad de que este compuesto pueda ser empleado para disminuir la IRA que se induce cuando se administra la GM en humanos.

Por otro lado, se identificó a la alicina en un extracto acuoso de ajo 16% (EAA, figura 27 y 28). Esto apoya la propuesta de que la alicina sea uno de los principios activos, responsable del efecto protector del polvo de ajo sobre la IRA inducida por la GM en ratas (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 2000); ya que posee propiedades antioxidantes (Prasad *et al.*, 1995). El efecto de este compuesto se evaluó *in vitro* y dichos experimentos se realizaron en las células LLC-PK₁ (una línea celular epitelial de túbulo proximal, porcina). Los resultados obtenidos muestran que la administración conjunta de la GM y del EAA, el EAE, la alina, la alicina o la SAC, no evitan la muerte celular inducida por la GM (Figuras 31 y 32). Este efecto podría estar asociado con las concentraciones empleadas de los compuestos o extractos, aunque la alicina en concentraciones de 300 μ M se vuelve tóxica para las células.

Otra posibilidad, es que sea necesaria la preincubación de las células con los compuestos o extractos, para lograr obtener algún efecto. En este contexto, cuando el EAE se administra 12 h antes de la GM, se logra observar un efecto parcialmente protector sobre la muerte celular inducida por la GM (Figura 33). Esto parecería indicar que la exposición previa de las células con los antioxidantes: 1) incrementa el contenido de estos en la célula, los cuales podrían actuar directamente como antioxidantes, sobre las ERO's que se producen y/o bien 2) podría estar activando ciertos mecanismos, que de alguna manera preparan a la célula para responder mejor y/o más rápido al reto oxidativo que se induce cuando se administra la GM. Por ejemplo, se sabe que el EAE induce un incremento en los niveles de glutatión (Wang *et al.*, 1999) e incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPx y CAT en células endoteliales (Wei & Lau, 1998), lo cual podría proteger a las células del estrés oxidativo inducido por la GM.



X. CONCLUSIONES

1. El extracto de ajo envejecido (EAE) disminuyó la insuficiencia renal aguda inducida por la GM, debido en parte a sus propiedades antioxidantes y a que previene la disminución de la actividad de GPx, GR y Mn-SOD.
2. La S-alilcisteína (SAC) disminuyó el daño renal inducido por la GM en ratas, lo que indica que éste podría ser uno de los compuestos responsables del efecto protector del EAE.
3. La SAC no evitó la muerte celular inducida por la GM *in vitro*. Estos datos sugieren que algunos de los compuestos que se generan del metabolismo de la SAC *in vivo*, y no la SAC misma, podrían ser los responsables del efecto protector encontrado con éste compuesto.



XI. PERSPECTIVAS

La SAC, al ser un compuesto polar, estable, de alta biodisponibilidad y que no afecta la capacidad bactericida de la GM; podría ser el candidato de elección, para una posible estrategia con fines profilácticos o terapéuticos en humanos que son tratados con este antibiótico.

Para evaluar el efecto terapéutico de la SAC, se debería desarrollar un protocolo en animales, donde éste compuesto se administre al mismo que la GM, además de que podrían evaluarse diferentes dosis de SAC para tratar de obtener un efecto dosis-respuesta. De esta manera se podría evaluar el efecto de la SAC sobre el daño renal que se induce al administrar GM. En este contexto, se podría pensar en la elaboración de una ampolla que tuviera la GM y la SAC, de esta manera los pacientes (a futuro) no tendrían que tomar en forma separada la SAC, sino que en la misma administración de GM adquirirían el agente protector.

De esta manera, si la SAC logrará disminuir la nefrotoxicidad inducida por la GM, el valor de éste antibiótico en la práctica clínica incrementaría enormemente y hasta podría sustituir el empleo de agentes más caros, los cuales también inducen insuficiencia renal aguda.

Por otro lado, los resultados encontrados en este trabajo, dejan abierto el panorama para profundizar en los mecanismos por los cuales se induce el daño renal inducido por la GM, y por los cuales el EAE y la SAC ejercen su efecto protector.

Debido a que en este trabajo se encontró un incremento en los niveles de proteínas nitradas, uno de los mecanismos que podría estudiarse es el papel del peroxinitrito en el daño renal inducido por la GM. El peroxinitrito es una especie reactiva de nitrógeno que se forma de la reacción entre el anión superóxido y el óxido nítrico, los cuales incrementan en el tratamiento con GM. En este contexto, si el peroxinitrito está involucrado en la nefrotoxicidad inducida por la GM, el empleo de compuestos que metabolicen éste radical *per se*, como las metaloporfirinas que descomponen peroxinitrito, podría generar un efecto protector. Adicionalmente se podría explorar si la NADPH oxidasa es la responsable del incremento en la producción de anión superóxido. También merecería estudiarse la participación de otras especies tóxicas como el singulete de oxígeno, el ácido hipocloroso u otras especies de nitrógeno, las cuales están involucradas en la fisiopatología de otras enfermedades. En este contexto, sería interesante evaluar si el EAE y la SAC son capaces de atrapar estas especies.



XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Attia FF. 1999. Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* **40**:183-187
- Ademuyiwa O, Ngaga EO, Ubah FO. 1990. Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Human Exp Toxicol* **9**:281-288
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**:121-126
- Ali BH. 2002. The effect of treatment with the medicinal plant *Rhazya stricta* decne on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* **9**:385-389
- Ali BH, Bashir AK. 1996. Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol* **27**:349-353
- Ali BH. 1995. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* **26**:1477-1487
- Al-Majed AA, Mostafa AM, Al-Rikabi AC, Al-Shabanah OA. 2002. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* **46**:445-451
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* **131**:955S-962S
- Appel GB. 1990. Aminoglycosides nephrotoxicity. *Am J Med* **88**(Suppl 3c):165-205
- Asahi M, Fujii J, Takao T, Kuzuya T, Hori M, Shimonishi Y, Taniguchi N. 1997. The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor. *J Biol Chem* **272**:19152-19157
- Atessahin A, Karahan I, Yilmaz S, Ceribasi AO, Princci I. 2003. The effect of manganese chloride on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* **48**:637-642
- Augusti KT, Sheela CG. 1996. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* **52**:115-119
- Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL. 2002. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* **32**:841-859
- Avissar NS, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. 1994. Human kidney proximal tubule are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* **266**:C367-C375
- Barrera D, Maldonado P, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverrí J. 2003. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$. *Free Radic Biol Med* **34**:1390-1398



BIBLIOGRAFÍA

- Barthomeuf CM, Debiton E, Barbakadze VV, Kemertelidze EP. 2001. Evaluation of the dietetic and therapeutic potential of a high molecular weight hydroxycinnamate-derived polymer from *Symphytum asperum* Lepech. Regarding its antioxidant, antilipoperoxidant, antiinflammatory, and cytotoxic properties. *J Agric Food Chem* **49**:3942-3946
- Ben-Ismael TH, Ali BH, Bashir AA. 1994. Influence of iron, deferoxamine and ascorbic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol* **25**:1249-1252
- Bennett WM. 1989. Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **16**:1-6
- Bergeron M, Guerette D, Forget J, Thiery G. 1980. Three-dimensional characteristics of the mitochondria of the rat nephron. *Kidney Int* **17**:175-185
- Bielski BHJ, Shlue GG, Bajuk S. 1980. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2^- and O_2^- radicals. *J Phys Chem* **84**:830-833
- Block E, Cai XJ, Uden PC, Zhang X, Quimby BD, Sullivan JJ. 1996. *Allium* chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl Chem* **68**:937-944
- Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **240**:500-508
- Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* **131**:1010S-1015S
- Brenner BM. 2000. The kidney. W.B. Saunders Company. 6a ed. USA
- Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* **250**:5475-5480
- Calderón E. 1996. Pasado, presente y futuro de la gentamicina. Scheramex. México.
- Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA. 1996. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* **98**:116-124
- Conlon BJ, Smith DW. 1998. Supplemental iron exacerbates aminoglycoside ototoxicity in vivo. *Hear Res* **115**:1-5
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D. 2002. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* **450**:67-76
- Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE. 1998. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* **5**:400-406
- Christensen EI, Moskaug JO, Vorum H, Jacobsen C, Gundersen TE, Nykjaer A, Blomhoff R, Willnow TE, Moestrup SK. 1999. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol* **10**:685-695



BIBLIOGRAFÍA

- Christensen EI, Gliemann J, Moestrup SK. 1992. Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *J Histochem Cytochem* **40**:1481-1490
- Christensen EI, Rennke HG, Carone FA. 1983. Renal tubular uptake of protein: effect of molecular charge. *Am J Physiol* **224**:F436-F441
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* **324**:1-18
- Dennerly PA. 2000. Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul* **36**:181-199
- Dillon SA, Burmi RS, Lowe GM, Billington D, Rahman K. 2003. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sci* **72**:1583-1594
- Dillon SA, Lowe GM, Billington D, Rahman K. 2002. Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F(2 alpha) in smoking and nonsmoking men and women. *J Nutr* **132**:168-171
- Duque I, García-Escribano C, Rodríguez-Puyol M, Díez-Marqu岸 ML, López-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodríguez-Puyol D. 1992. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* **263**:F466-F473
- Edson RS, Terrell CL. 1999. The aminoglycosides. *Mayo Clin Proc* **74**:519-528
- Erdem A, Gundogan NU, Usubutun A, Kilinc K, Erdem SR, Kara A, Bozkurt A. 2000. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant* **15**:1175-1182
- Ericsson JL, Trump BF. 1966. Electron microscopic studies of the proximal tubule of the rat kidney. III. Microbodies, multivesicular bodies, and the golgi apparatus. *Lab Inv* **15**:1610-1633
- Ford DM, Thieme RE, Lamps CA, Covington SJ, Molitoris BA. 1995. HWA-448 reduces gentamicin toxicity in LLC-PK₁ cells. *J Pharmacol Exp Ther* **274**:29-33
- Freeman F, Kodera Y. 1995. Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. *J Agric Food Chem* **43**:2332-2338
- Geng Z, Rong Y, Lau BH. 1997. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* **23**:345-335
- Geng Z, Lau BH. 1997. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* **11**:54-56
- Guidet BR, Shah SV. 1989. *In vivo* generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* **256**:F158-F164



BIBLIOGRAFÍA

- Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* **165**:215-219
- Heidrich HG, Kinne R, Kinne-Saffran E, Hannig K. 1972. The polarity of the proximal tubule cell in rat kidney. Different surface charge for the brushborder microvilli and plasma membranes from the basal infoldings. *J Cell Biol* **54**:232-245
- Heinz VM. 1983. Renal Function: Mechanism Preserving Fluid and Solute Balance in Health. 2nd edition. Little, Brown and Company. USA. 1-10
- Ho SE, Ide N, Lau BH. 2001. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* **8**:39-46
- Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. 1991. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**:278-286
- Huang MY, Schacht J. 1990. Formation of a cytotoxic metabolite from gentamicin by liver. *Biochem Pharmacol* **40**:R11-R14
- Iberl B, Winkler G, Müller B, Knobloch K. 1990. Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med* **56**:320-326
- Ide N, Lau BH. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J Nutr* **131**:1020S-1026S
- Ide N, Lau BH. 1999a. Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine* **6**:125-131
- Ide N, Lau BH. 1999b. S-allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Dev Ind Pharm* **25**:619-624
- Ide N, Lau BH. 1997. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J Pharm Pharmacol* **49**:908-911
- Ide N, Nelson AB, Lau BH. 1997. Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* **63**:263-264
- Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* **10**:340-341
- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* **60**:417-420
- Iqbal M, Athar M. 1998. Attenuation of iron-nitritoltriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem Toxicol* **36**:485-495
- Iqbal J, Whitney P. 1991. Use of cyanide and diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med* **10**:69-77



BIBLIOGRAFÍA

- Josepovitz C, Pastoriza-Munoz E, Timmerman D, Scott M, Feldman S, Kaloyanides GJ. 1982. Inhibition of gentamicin uptake in rat renal cortex in vivo by aminoglycosides and organic polycations. *J Pharmacol Exp Ther* **223**:314-321
- Jung K, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. 1991. Methods compared for determining activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme* **45**:215-221
- Kacew S, Bergeron MG. 1990. Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* **51**:241-259
- Kacew S. 1989. Inhibition of gentamicin-induced nephrotoxicity by piridoxal-5-phosphate in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **248**:360-366
- Kaloyanides GJ. 1984. Aminoglycoside-induced functional and biochemical defects in the renal cortex. *Fundam Appl Toxicol* **4**:930-943
- Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y. 2001. Pharmacologic activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. *J Nutr* **131**:1080S-1084S
- Kays SE, Crowell WA, Johnson MA. 1992. Iron supplementation increases gentamicin nephrotoxicity in rats. *J Nutr* **121**:1869-1875
- Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic Biol Med* **30**:747-756
- Kodera Y, Suzuki A, Imada O, Kasuga S, Sumioka I, Kanazawa A, Taru N, Fujikawa M, Nagae S, Masamoto K, Maeshige K, Ono K. 2002. Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J Agric Food Chem* **50**:622-632
- Kojima R, Toyama Y, Ohnishi ST. 1994. Protective effects of an aged garlic extracts on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. *Nutr Cancer* **22**:163-173
- Kourounakis PN, Rekka EA. 1991. Effect on active oxygen species of alliin and allium sativum (garlic) powder. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **74**:249-252
- Krinsky NI. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* **200**:248-254
- Kumar KV, Shifow AA, Naidu MU, Ratnakar KS. 2000. Carvedilol: a beta blocker with antioxidant property protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci* **66**:2603-2611
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. 1990. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* **40**:2383-2392



BIBLIOGRAFÍA

- Laurent G, Tulkens PM. 1987. Aminoglycoside nephrotoxicity: cellular and molecular aspects. *Pharmacol* **1**:40-44
- Lautermann J, McLaren J, Schacht J. 1995. Glutathione protection against gentamicin ototoxicity depends on nutritional status. *Hear Res* **86**:15-24
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **71**:952-958
- Lawson LD. 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. ACS Symposium Series 691. Lawson LD, Bauer R, (eds). Washington, DC, USA. American Chemical Society:176-209
- Lawson LD. 1996. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: *Garlic. The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*. Koch HP, Lawson LD (eds). Baltimore, MD, USA. Williams & Wilkins:37-107
- Lawson LD, Wang ZJ, Hughes BG. 1991. γ -glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* sp: precursors of AGE-dependent *trans*-1-propenyl. *J Nat Prod* **54**:436-444
- Lerner SA, Schmitt BA, Seligosohn R, Matz GJ. 1986. Comparative study of ototoxicity and nephrotoxicity in patients randomly assigned to treatment with amikacin or gentamicin. *Am J Med* **80**:98-104
- Lewin G, Popov I. 1994. Antioxidant effects of aqueous garlic extract. 2nd communication: inhibition of the Cu^{2+} -initiated oxidation of low density lipoproteins. *Drug Res* **44**:604-607
- Long HB, Halliwell B. 2001. Antioxidant and prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods Enzymol* **335**:181-190
- Long LH, Evans PJ, Halliwell B. 1999. Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **262**:605-609
- Lowry OA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:267-275
- MacMillan-Crow LA, Thompson JA. 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **366**:82-88
- Martínez-Salgado C, Eleno N, Tavares P, Rodríguez-Barbero A, García-Criado J, Bolaños JP, Lopez-Novoa JM. 2002. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int* **62**:1682-1692
- Mazzon E, Britti D, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. 2001. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* **424**:75-83
- Moestrup SK, Cui S, Vorum H, Bregengard C, Bjorn SE, Norris K, Gliemann J, Christensen EI. 1995. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalín mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest* **96**:1404-1413



BIBLIOGRAFÍA

- Morales AI, Buitrago JM, Santiago JM, Fernandez-Tagarro M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F. 2002. Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antioxid Redox Signal* **4**:893-898
- Morihara N, Sumioka I, Moriguchi T, Uda N, Kyo E. 2002. Aged garlic extract enhances production of nitric oxide. *Life Sci* **71**:509-517
- Mostafa MG, Mima T, Ohnishi ST, Mori K. 2000. S-allylcysteine ameliorates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Med* **66**:148-151
- Naidu MU, Shifow AA, Kumar KV, Ratnakar KS. 2000. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* **7**:191-197
- Nagae S, Ushijima M, Hatono S, Imai J, Kasuga S, Matsuura H, Itakura Y, Higashi Y. 1994. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med* **60**:214-217
- Nagai J, Tanaka H, Nakanishi N, Murakami T, Takano M. 2001. Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**:F337-F344
- Nakajima T, Hishida A, Kato A. 1994. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* **266**:F425-F431
- Nakagawa S, Masamoto K, Sumiyoshi H, Harada H. 1984. Acute toxicity of garlic extract. *J Toxicol Sci* **9**:57-60
- Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. 1992. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **32**:449-470
- Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* **46**:849-854
- Numagami Y, Ohnishi ST. 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr* **131**:1100S-1105S
- Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* **29**:135-143
- 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
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. 1999. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* **96**:507-515
- Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* **105**:457-464
- Orlando RA, Rader K, Authier F, Yamazaki H, Posner BI, Bergeron JJ, Farquhar MG. 1998. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol* **9**:1759-1766



BIBLIOGRAFÍA

- Owen PL, Johns T. 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol* **64**:149-160
- Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA. 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **349**:1-6
- Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Barrera D, Cerón A, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 2003a. Protective effect of diallyl sulfide on oxidative stress and nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Mol Cell Biochem* **254**:125-130
- Pedraza-Chaverrí J, González-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 2003b. Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* **473**:71-78
- Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* **29**:602-611
- 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, Cruz C, Larriva-Sahd J, Juárez RM, Orozco H, Hernández-Pando R, Tapia E. 1995. Angiotensin I converting enzyme in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* **17**:365-375
- Pedraza-Chaverrí J, Tapia E, Bobadilla N. 1992. Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the spin-trapping agent α -phenyl-*N*-*tert*-butyl nitron (PBN). *Ren Fail* **14**:467-471
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. 1995. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem* **148**:183-189
- Priuska EM, Schacht J. 1995. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* **50**:1749-1752
- Ramsammy L, Josepovitz C, Lane BP, Kaloyanides GJ. 1989. Polyaspartic acid protects against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **250**:149-153
- Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* **233**:357-363
- Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R. 1993. Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* **119**:143-150
- Rister M, Baehner RL. 1976. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest* **58**:1174-1184



BIBLIOGRAFÍA

- Rivas-Cabañero L, Rodríguez-López AM, Martínez-Salgado C, Saura M, Lamas S, López-Novoa JM. 1997. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp Nephrol* **5**:23-30
- Rivas-Cabañero L, López-Novoa JM, Arévalo M. 1995. Effect of N^G-nitro-L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Nephron* **1**:203-207
- Saito H, Inui KI, Hori R. 1986. Mechanisms of gentamicin transport in kidney epithelial cell line (LLCPK₁). *J Pharmacol Exp Ther* **238**:1071-1076
- Sastrasinh M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD. 1982. Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *J Pharmacol Exp Ther* **222**:350-358
- Sato T, Miyata G. 2000. The nutraceutical benefit, part iv: garlic. *Nutrition* **16**:787-788
- Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, Willnow TE. 2002. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J Biol Chem* **277**:618-622
- Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. 1981. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* **19**:288-296
- Sener G, Sehirli AO, Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S, Ayanoglu-Dulger G. 2002. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* **32**:231-236
- Sha SH, Schacht J. 1999. Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin. *Free Radic Biol Med* **26**:341-347
- Shah SV, Walker PD. 1992. Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure. *Ren Fail* **14**:363-370
- Silverblatt FJ, Kuehn C. 1979. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* **15**:335-345
- Song BB, Anderson DJ, Schacht J. 1997. Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* **282**:369-377
- Song BB, Schacht J. 1996. Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig *in vivo*. *Hear Res* **94**:87-93
- Stadtman ER. 1992. Protein oxidation and aging. *Science* **257**:1220-1224
- Steinmassl D, Pfaller W, Gstraunthales G, Hoffmann W. 1995. LLC-PK₁ epithelia as a model for *in vitro* assessment of proximal tubular nephrotoxicity. *In vitro Cell Dev Biol* **31**:94-106
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**:1043-1046



BIBLIOGRAFÍA

- Tisher CC, Madsen KM. 2000. Anatomy of the kidney. In: The kidney. Brenner BM and Rector FC Jr. Brenner Ed. Saunders Co., Philadelphia. 3-67
- Tulkens PM. 1989. Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol Lett* **46**:107-123
- Ueda N, Guidet B, Shah SV. 1993. Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* **265**:F435-F439
- Varalakshmi P, Sandhya S, Malarkodi KP. 2003. Evaluation of the effect of lipoic acid administered along with gentamicin in rats rendered bacteremic. *Mol Cell Biochem* **248**:35-40
- Walker PD, Barri Y, Shah SV. 1999. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* **21**:433-442
- Walker PD, Shah SV. 1988. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* **81**:334-341
- Walker PD, Shah SV. 1987. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* **253**:C495-C499
- Wang BH, Zuzel KA, Rahman K, Billington D. 1999. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* **132**:215-225
- Washington JA. 1985. Susceptibility test: agar dilution. In: Manual of clinical microbiology. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, (eds). Washington, DC. American Society for Microbiology: 967-971
- Wei Z, Lau BH. 1998. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* **18**:61-70
- Weinberg DS, Manier ML, Richardson MD, Haibach FG. 1993. Identification and quantification of organosulfur compliance markers in garlic extract. *J Agric Food Chem* **41**:37-41
- Weinberg JM, Hunt D, Humes HD. 1985. Distribution of gentamicin among subcellular fractions from rat renal cortex. *Biochem Pharmacol* **34**:1779-1787
- Welling LW, Welling DJ. 1975. Surface areas of brush border and lateral cell walls in the rabbit proximal nephron. *Kidney Int* **8**:343-348
- Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. 1976. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* **69**:85-91
- Whitin JC, Tham DM, Bhamre S, Ornt DB, Scandling JD, Tune BM, Salvatierra O, Avissar N, Cohen HJ. 1998. Plasma glutathione preoxidase and its relationship to renal proximal tubule function. *Mol Genet Metab* **65**:238-245
- Yamasaki T, Li L, Lau BH. 1994. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother Res* **8**:408-412



BIBLIOGRAFÍA

Yang CL, Du XH, Han YX. 1995. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* **17**:21-26

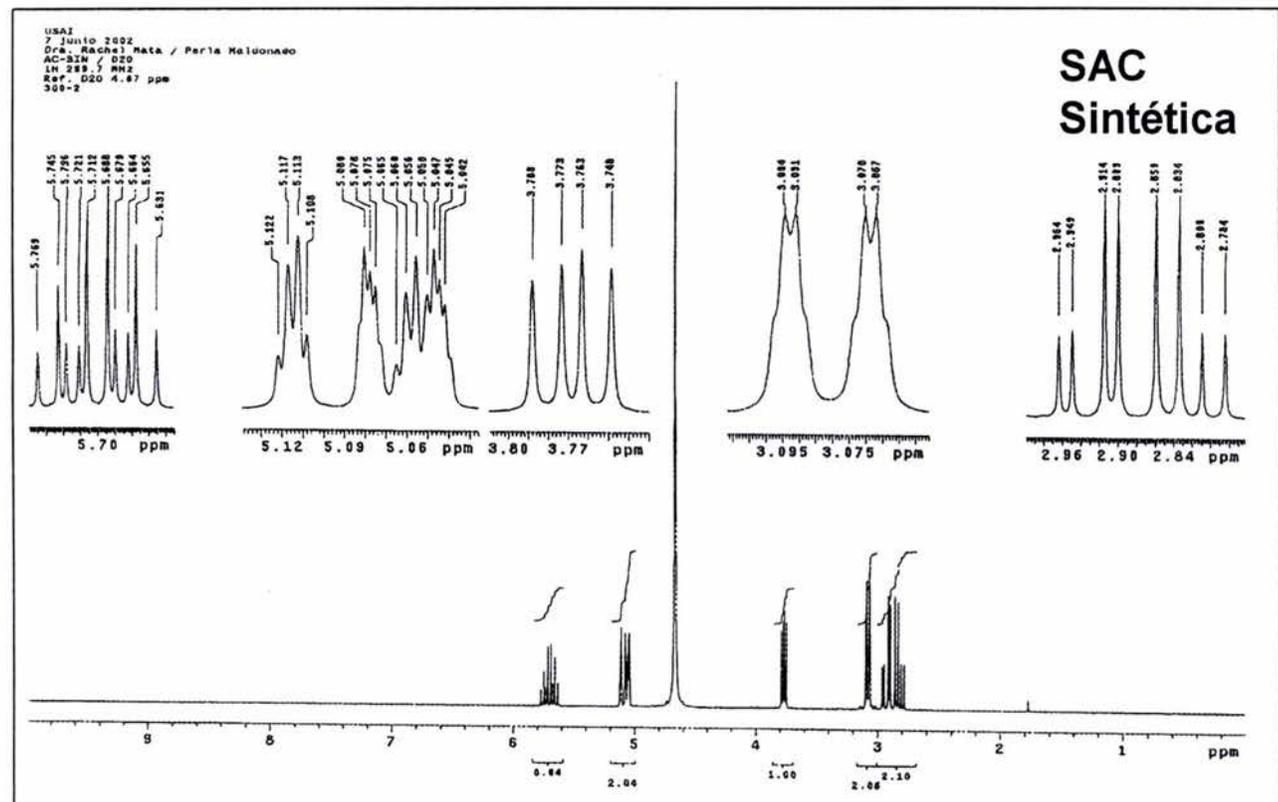
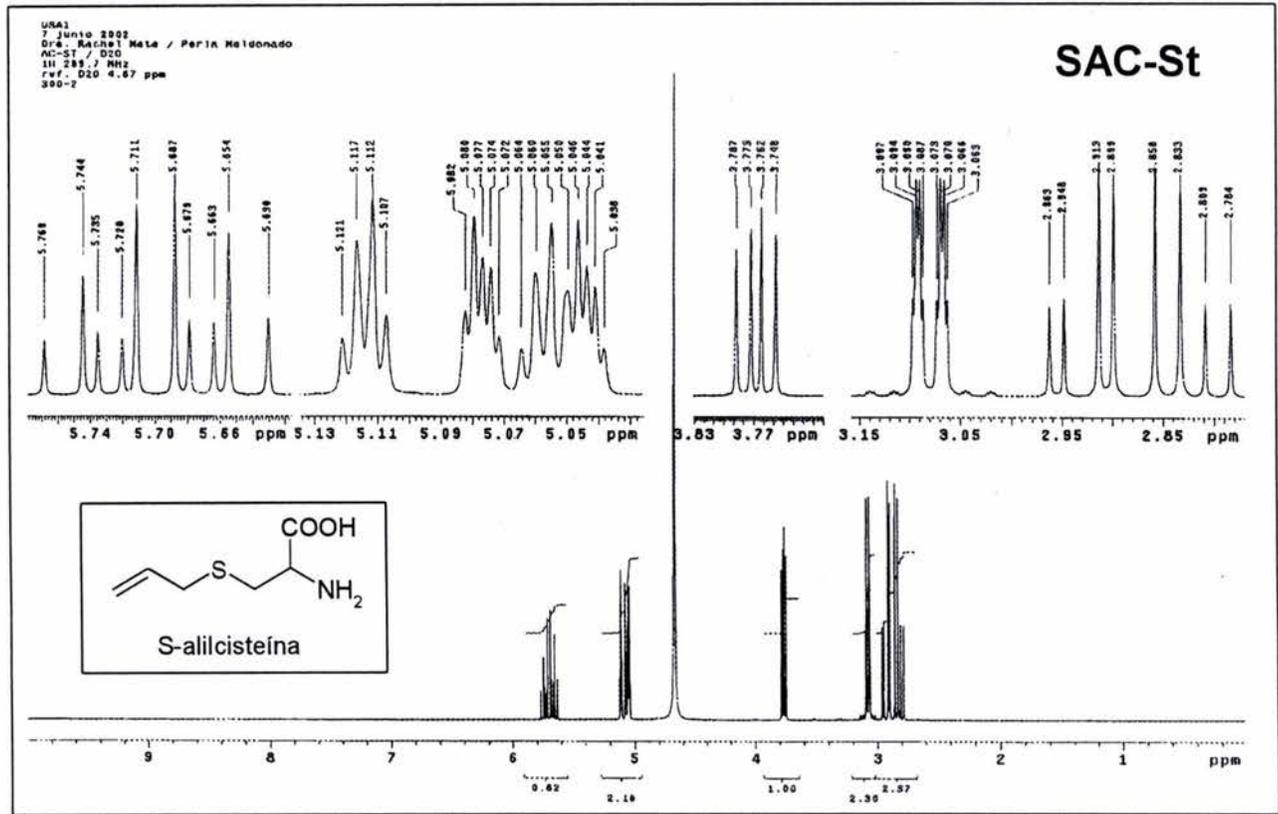
Yoshida S, Hirao Y, Nakagawa S. 1984. Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic. *J Toxicol Sci* **9**:77-86

Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**:139-162

Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, McCluskey RT. 1994. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem* **42**:531-542



XIII. APÉNDICE





ANTIOXIDANT S-ALLYLCYSTEINE PREVENTS GENTAMICIN-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND RENAL DAMAGE

PERLA D. MALDONADO,* DIANA BARRERA,* ISABEL RIVERO,[†] RACHEL MATA,[†] OMAR N. MEDINA-CAMPOS,*
ROGELIO HERNÁNDEZ-PANDO,[‡] and JOSÉ PEDRAZA-CHAVERRÍ*

Department of *Biology and [†]Pharmacy, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México D.F., México; and [‡]Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México D.F., México

(Received 25 February 2003; Revised 24 April 2003; Accepted 7 May 2003)

Abstract—Acute renal failure (ARF) is a major complication of gentamicin (GM) treatment, which is effective against gram-negative infections. Since experimental evidence suggests a role of reactive oxygen species (ROS) in GM-induced ARF, in this work we studied the effect of a garlic-derived compound, S-allylcysteine (SAC), which is a free radical scavenger, on GM-induced nephrotoxicity. In rats treated with GM (70 mg/kg/12 h/4 days/s.c.), ARF was evident by the: (i) decrease in creatinine clearance and increase in blood urea nitrogen, (ii) decrease in blood glutathione peroxidase (GPx) activity and increase in urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and total protein, and (iii) necrosis of proximal tubular cells. These alterations were prevented by SAC treatment (250 mg/kg/i.p. 24 h before the first dose of GM and 125 mg/kg/12 h/4 days along GM-treatment). Furthermore, SAC prevented the GM-induced oxidative stress (protein carbonyl groups) and the decrease in manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), GPx, and glutathione reductase (GR) activities in renal cortex. In conclusion, SAC ameliorates the GM-induced ARF by a mechanism related, at least in part, to its ability to decrease oxidative stress and to preserve antioxidant enzymes activity in renal cortex. © 2003 Elsevier Inc.

Keywords—S-allylcysteine, Gentamicin, Garlic, Acute renal failure, Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, Oxidative stress, Free radicals

INTRODUCTION

Gentamicin (GM) is an aminoglycoside antibiotic widely used in the clinical practice for the treatment of life-threatening gram-negative infections [1] due to (i) it possesses a wide bactericide spectre, especially against gram-negative bacteria, (ii) it is effective against resistant β -lactamic microorganisms, (iii) its low cost, and (iv) the low levels of resistance it induces among enterobacteriaceae family bacterium [2]. However, acute renal failure (ARF) is a major complication of GM treatment that widely limits its use and complicates and increases the price of the treatment. The renal toxicity incidence in 10–20% of the patients treated with GM [3] has motivated the work of several groups of researchers

aiming to find effective and safe practices that can ameliorate GM-induced ARF. It has been clearly shown that oxidative stress is involved in GM-induced renal damage [4–8]; GM induces superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical (HO) production from renal mitochondria [7,8], and H_2O_2 generation [5], lipoperoxidation [4,9–14], nitrotyrosine content [4,15], and protein carbonyl content [16,17] are increased and reduced glutathione is diminished [10,16] in renal cortex from GM-treated rats. Moreover, the oxidative damage also has been supported by the fact that the administration of several compounds with antioxidant properties, ROS scavengers, and/or antioxidant enzymes are able to ameliorate the severity of GM-induced renal damage; these include dimethylthiourea [9,18], sodium benzoate [18], deferoxamine [18], superoxide dismutase (SOD) [9,19], SOD mimetic [4], vitamin E and selenium [20,21], probucol [21], carvedilol [13], N-acetylcysteine [15], melatonin [16], taurine [22], ginkgo biloba extract

Author correspondence to: Dr. José Pedraza-Chaverrí, Facultad de Química, Edificio “B”, Segundo Piso, Lab 209, Ciudad Universitaria, UNAM, 04510 México D.F., México; Tel: +55 (56) 22-35-15; Fax: +55 (56) 22-35-15; E-Mail: pedraza@servidor.unam.mx.

[12], medicinal plant *Rhazya stricta* decne [10], arabic gum [11], and garlic powder [14]. In addition, the kidneys from GM-treated rats are more vulnerable to ROS due to a deficiency of the antioxidant enzymes superoxide dismutase [11,14,17,23,24], glutathione peroxidase (GPx) [14,17,24], glutathione reductase (GR) [17], and catalase (CAT) [14,17,23,24].

Recently, our laboratory found that aged garlic extract (AGE) prevented the tubular and glomerular alterations induced by GM treatment, effects associated, at least in part, with the antioxidant properties of AGE [17]. The protective effect of AGE suggests that this extract contains compounds that could potentially ameliorate GM-induced ARF in rats. The composition of AGE has been reported [25] and it is known that during aging (up to 20 months) unstable and highly odorous compounds in fresh garlic are converted into more stable, odorless, water-soluble and less expensive compounds [26]. Indeed, some compounds, such as S-allylcysteine (SAC, the most abundant organosulfur compound in AGE) [25,27–39] and S-allylmercaptocysteine (SAMC) [38–40] have antioxidant properties. It has been postulated that SAC could be one of the active compounds responsible for the protective effect of AGE in several experimental models associated with oxidative stress [27–30,34,35,38,39]. It has been clearly shown that SAC has antioxidant properties both *in vivo* [29–31] and *in vitro* [27,28,33–39]. *In vivo*, SAC reduces edema formation in the ischemic rat brain, by a mechanism that seems to involve the inhibition of lipid peroxidation [29,30], and reduces the histological damage in heart and liver of mice treated with doxorubicin, an anticancer drug [31]. *In vitro*, SAC is able to scavenge O_2^- [27], H_2O_2 [36], and HO [27]. SAC also prevents (i) H_2O_2 -induced endothelial cell injury and lipid peroxidation [28,36] and (ii) low-density lipoprotein oxidation [33–36,38]. Additionally, SAC differentially regulates nitric oxide (NO) production by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression in macrophages while increasing NO in endothelial cells that may contribute to its anti-inflammatory effect [27]. Geng *et al.* have shown that SAC may block H_2O_2 -induced nuclear factor kappa B activation [37]. Based on the above-mentioned data, the hypothesis was made that SAC could ameliorate GM-induced oxidative stress and renal damage. In this article the effect of SAC on GM-induced oxidative stress, decrease in antioxidant enzymes (Mn-SOD, GPx, GR, and CAT), and renal damage in rats is presented.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

S-allylcysteine standard (SAC-St) was kindly provided by Wakunaga of America Co., Ltd. (Mission

Viejo, CA, USA); GM was from Schering-Plough (Mexico City, Mexico); commercial kits to measure creatinine and urea were from Spinreact (Girona, Spain). All other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Synthesis and antioxidant activity of S-allylcysteine (SAC)

SAC, used in the animal studies, was synthesized by the reaction of L-cysteine with allyl bromide and purified by recrystallization from ethanol-water [41]. The final product was compared to its identification with SAC-St by 1H nuclear magnetic resonance (1H NMR) spectroscopy. The *in vitro* antioxidant ability of SAC was confirmed by measuring its scavenging activity on O_2^- and H_2O_2 . O_2^- was generated using the xanthine/xanthine oxidase system, and scavenging activity was determined by the nitroblue tetrazolium (NBT) reduction [42]. H_2O_2 was measured by the ferrous ion oxidation-xylenol orange assay [43].

Experimental design

Male Wistar rats (Harlan Teklad, Mexico City, Mexico) initially weighing 230–278 g were used. All animals had free access to water and commercial rodent diet (Harlan Teklad), and were randomly divided into four groups as follows: (i) CT, injected subcutaneously (*s.c.*) and intraperitoneally (*i.p.*) with saline; (ii) GM, treated with GM; (iii) SAC, treated with SAC; and (iv) GM + SAC, treated with GM and SAC. GM-treated rats received 70 mg/kg *b.w./s.c./12 h* for 4 d and SAC-treated rats received a single dose of 250 mg/kg *b.w./i.p.* 24 h before the first dose of GM or saline, and 125 mg/kg *b.w./i.p./12 h* for 4 d along with GM treatment or saline. During the study, rats were maintained with a 12 h light:dark cycle in stainless steel metabolic cages to collect 24 h urine. Urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and total protein were measured on days 0, 4, and 5. Animals were sacrificed on day 5 by decapitation and blood was collected to obtain serum and measure creatinine, urea, and GPx activity. One kidney was removed to obtain cortex samples for histological studies and the other kidney was removed to obtain cortex and measure the activity of total SOD, Mn-SOD, catalase (CAT), GPx, and GR.

Markers of glomerular and tubular damage

The markers of glomerular damage, creatinine and urea, were measured using commercial kits. Creatinine clearance was calculated with the standard formula, and blood urea nitrogen (BUN), was obtained correcting the urea value by a 2.14 factor. As markers of tubular damage, we measured urinary excretion of NAG and total

protein and blood GPx activity. NAG activity was measured using p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide as substrate [14], total protein was measured according to Lowry as previously described [44], and blood GPx activity was measured using GR and NADPH (β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form) in a coupled reaction [45].

Histological analysis

Kidney sections of 4 μ m of thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H&E) [46]. The histological profile of 20 proximal tubules randomly selected per rat (three rats per experimental group) was recorded, using a Leica Qwin Image Analyzer (Cambridge, UK). The percentage of tubular area with histopathological alterations like swelling, cytoplasmic vacuolization, desquamation, or necrosis was obtained.

Oxidative stress marker

Protein carbonyl groups, a relatively stable marker of protein oxidation by ROS [47], were detected by their reactivity with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form protein hydrazones in renal cortex [46].

Antioxidant enzymes in renal cortex

Total SOD activity was assayed by a previously reported method using NBT [45]. To measure Mn-SOD activity, copper/zinc-containing SOD (Cu,Zn-SOD) was inhibited with diethyldithiocarbamic acid (DDC) [45]. Cu,Zn-SOD activity was obtained by subtracting the activity of the DDC-treated samples from that of total SOD activity. GPx activity was assayed as previously described [45] and GR activity was assayed measuring the disappearance of NADPH [17]. CAT activity was assayed by a method based on the disappearance of H_2O_2 [48].

Statistics

Results are expressed as the mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. Nonpaired *t*-test was used to compare the quantitative histological damage data using the software Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA). $p \leq .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Synthesis and antioxidant properties of SAC

The 1H NMR analysis indicates that the compound obtained by synthesis is SAC, which was compared with SAC-St (data not shown). Furthermore, SAC obtained scavenged O_2^- and H_2O_2 in a concentration-dependent manner (data not shown), confirming that the compound

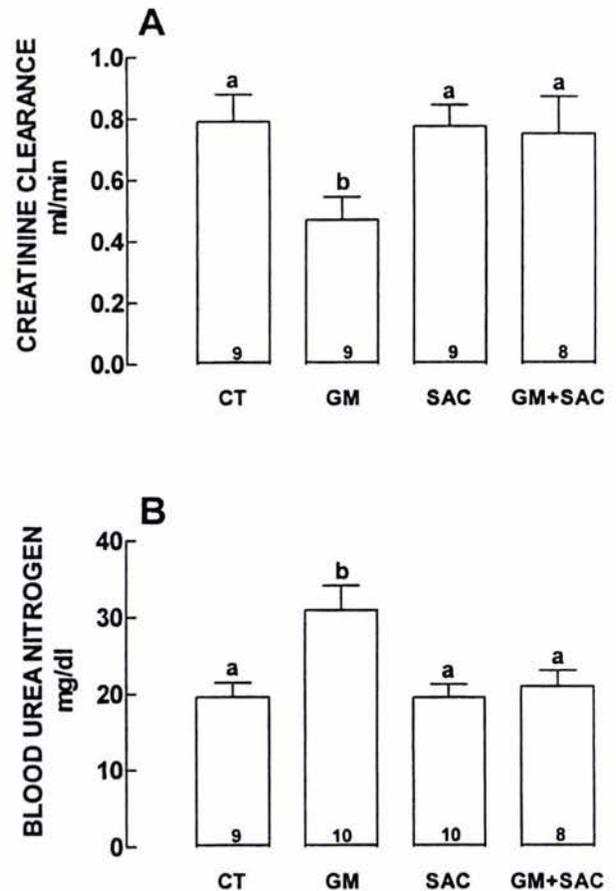


Fig. 1. Creatinine clearance (A) and blood urea nitrogen (B) on day 5 in the four groups of rats studied: CT = control group, GM = gentamicin group, SAC = S-allylcysteine group, and GM+SAC = gentamicin+S-allylcysteine group. Groups with different letter are significantly different ($p < .001$). *n* for each group is printed in its respective bar.

obtained by chemical synthesis have antioxidant properties, as previously reported [27,34–36].

Body weight and urinary volume

Body weight was not statistically different among the four groups in the study and on day 5: CT = 270 ± 11 , GM = 260 ± 14 , SAC = 264 ± 15 , and GM + SAC = 263 ± 12 g. On day 5, urinary volume increased significantly in the GM group (CT = 9 ± 1 and GM = 16 ± 3 ml), and SAC was unable to prevent this increase in the GM + SAC group (GM + SAC = 12 ± 4 ml).

Markers of glomerular and tubular damage

Creatinine clearance decreased 40% and BUN increased 58% in the GM group compared to the CT one (Fig. 1A and B). SAC almost completely prevented these changes in the GM + SAC group. GM increased urinary excretion of NAG and total protein on days 4 and 5 (Fig. 2A and B), reaching the highest excretion on day 5 (4.7

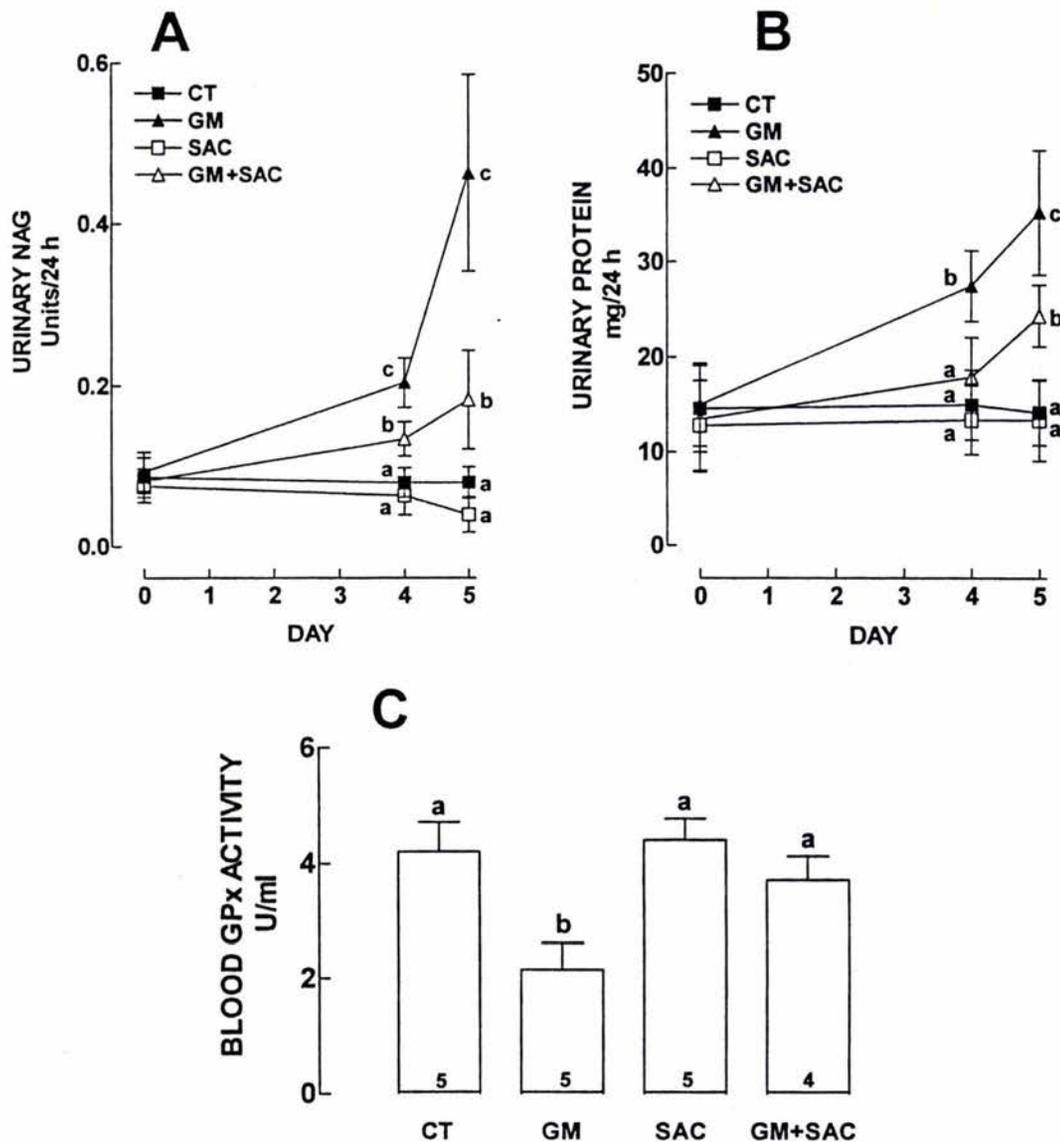


Fig. 2. Urinary excretion of NAG (A) and total protein (B) and blood GPx activity (C) in the four groups of rats studied. Groups with different letter are significantly different ($p < .001$), in the same day. In A and B figures, $n = 7-10$, and in C figure n for each group is printed in its respective bar.

times for NAG and 1.5 times for total protein). The increases in both parameters were partially prevented by SAC on days 4 and 5. Blood GPx activity diminished 49% in the GM group and the treatment with SAC was able to effectively prevent this reduction in the GM + SAC group (Fig. 2C). Creatinine clearance, BUN, urinary excretion of NAG and total protein, and blood GPx activity were similar in the CT and SAC groups (Figs. 1 and 2).

Histological analysis

Rats treated with GM showed vacuolization and necrosis in the proximal tubular epithelial cells (Fig.

3). The percentage of damaged tubular area in the GM group was of $85 \pm 12\%$ and the treatment with SAC significantly decreased this percentage to $29 \pm 16\%$ (GM + SAC group, Fig. 3). There were no renal histological alterations in the CT and SAC groups (Fig. 3).

Oxidative stress marker

GM treatment induced an 89% increase in the protein carbonyl content in renal cortex compared to the CT group (Fig. 4). The increase induced by GM was completely prevented by SAC (GM + SAC group). The protein carbonyl content was similar in the CT and SAC groups.

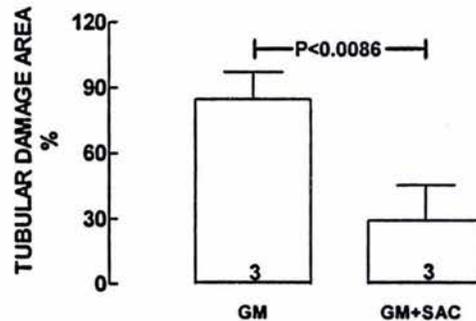
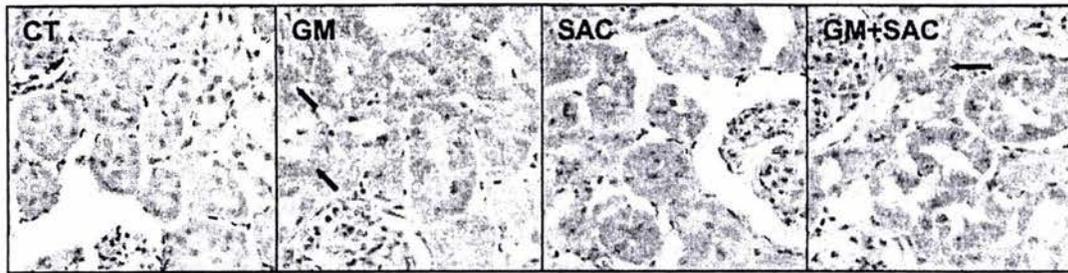


Fig. 3. Representative light microscopic findings in the renal cortex from the four groups of rats studied on day 5. GM-treated rats showed necrosis (arrows) and vacuolization in the proximal tubular epithelial cells. Histological damage decreased in the GM+SAC group; H&E, 200 \times . Graph represents the quantitative tubular damage on day 5; *n* for each group is printed in its respective bar.

Antioxidant enzymes in renal cortex

Total SOD and Mn-SOD activities diminished 16% and 22%, respectively, in GM-treated rats. SAC almost completely prevented the decrease in Mn-SOD and total SOD activity in the GM + SAC group. Cu,Zn-SOD remained unaffected by the GM-treatment (Table 1). GPx and GR activities decreased 33% and 39%, respectively, in GM-treated rats. These decreases were effectively prevented by SAC in the GM + SAC group (Table

1). CAT activity decreased 52% in rats treated with GM, but SAC was unable to prevent this decrease in the GM + SAC group (Table 1). Total SOD, Mn-SOD, Cu,Zn-SOD, GPx, GR, and CAT activities were similar in the CT and SAC groups (Table 1).

DISCUSSION

GM is an aminoglycoside widely used in clinical practice for the treatment of gram-negative infections. Although this drug has proven its usefulness, its nephrotoxic action limits the extent of its use. Evidence suggests that ROS may be involved in GM-induced ARF, since it has been found that O_2^- , H_2O_2 , and HO increase with GM treatment [4–8] and it is known that several agents that scavenge or interfere with ROS production successfully ameliorate GM-induced nephropathy [4–24]. Our laboratory found that garlic powder [14], and more recently AGE [17], an odorless, commercially available garlic presentation and a well-known antioxidant [27,28,32,35,49,50], prevented the tubular and glomerular alterations induced by GM treatment, effects associated, at least in part, with the antioxidant properties of garlic powder and AGE. The results obtained with AGE prompted us to find the AGE active compound, since the identification and the use of it would have a

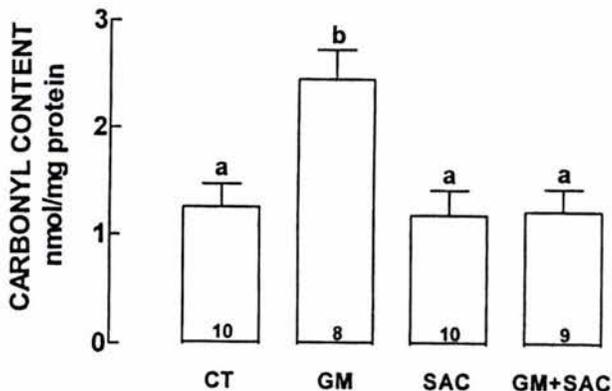


Fig. 4. Carbonyl content in the renal cortex from the four groups of rats studied on day 5. Groups with different letter are significantly different ($p < .001$); *n* for each group is printed in its respective bar.

Table I. Antioxidant Enzymes Activity in Renal Cortex from the Four Groups of Rats Studied on Day 5

	CT	GM	SAC	GM+SAC
Total SOD (U/mg protein)	18.0 ± 0.9 ^a	15 ± 0.6 ^b	19 ± 1.0 ^a	18 ± 0.6 ^a
Mn-SOD (U/mg protein)	7 ± 0.5 ^a	5 ± 0.4 ^b	6.7 ± 0.6 ^a	6.3 ± 0.4 ^a
Cu,Zn-SOD (U/mg protein)	12 ± 1.1 ^a	10 ± 0.7 ^a	12 ± 0.8 ^a	11.6 ± 1.0 ^a
GPx (U/mg protein)	0.15 ± 0.008 ^a	0.1 ± 0.009 ^b	0.15 ± 0.008 ^a	0.15 ± 0.01 ^a
GR (U/mg protein)	0.095 ± 0.006 ^a	0.06 ± 0.007 ^b	0.09 ± 0.003 ^a	0.09 ± 0.005 ^a
CAT (k/mg protein)	0.33 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.05 ^b	0.31 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.04 ^b

Values are mean ± SD; groups with different letters are significantly different ($p < .001$); $n = 9-10$.

CT = control; GM = gentamicin; SAC = S-allylcysteine; Mn-SOD = manganese superoxide dismutase; Cu,Zn-SOD = copper/zinc superoxide dismutase; GPx = glutathione peroxidase; GR = glutathione reductase; CAT = catalase.

better acceptance in clinical practice. AGE is a garlic presentation whose composition has been reported [25], and it has been postulated that SAC [27–38,50] and SAMC [38–40,50] are two of the compounds that might play an important role in the antioxidant activity of AGE because they are potent antioxidants.

SAC is the most abundant organosulfur compound in AGE (6.1 ± 2.7 mg/g dry extract), which has been used to standardize commercial aged extracts [25]. Furthermore, SAC has the following characteristics: (i) water soluble; (ii) stable, the stability remains for up to 2 years [25]; (iii) odorless; (iv) less toxic than other garlic compounds, it is 30-fold less toxic than allicin and diallyl-disulfide (DADS). The 50% lethal oral dose (mg/kg body) in male mice was 8890 for SAC, 309 for allicin, and 145 for DADS, and in females was 9390 for SAC, 363 for allicin, and 130 for DADS [26]; (v) high bioavailability, it is easily absorbed in the gastrointestinal tract and can be detected in the plasma, liver, and kidney after oral intake, with a bioavailability of 103% in mice, 98% in rats, and 87.2% in dogs [51]; and (vi) less expensive, since its synthesis is easy and cheap [41].

Taking into account the SAC characteristics, in the present study we investigated the effect of SAC on GM-induced ARF in order to gain new insights into the prophylaxis of GM-induced nephrotoxicity, which is a common problem limiting the use of this drug.

SAC effectively prevented the decrease in creatinine clearance and the increase in BUN (glomerular function markers) induced by GM treatment. The alteration in glomerular function cannot be attributed to structural damage, since glomeruli structure is normal in GM-treated rats [14], but it has been found that GM treatment increases H_2O_2 [5,8] and O_2^- [4,8] production, and it is known that these ROS induce mesangial cells contraction, altering the filtration surface area and modifying the ultrafiltration coefficient, factors that decrease the glomerular filtration rate (GFR) [52,53]. Moreover, O_2^- can react with NO (a vasodilator) to form peroxynitrite, a cytotoxic oxidant radical specie. Due to this, the inactivation of NO by O_2^- could be another mechanism that leads to a decrease in GFR [54]. These data indicate that

H_2O_2 and O_2^- could be involved in the decrease of GFR in GM-induced nephrotoxicity, and that the protective effect of SAC could be associated with its ability to scavenge O_2^- [27] and H_2O_2 [36] and/or with its ability to effectively prevent the decrease in Mn-SOD activity.

It has been suggested that several mechanisms may lead to the tubular damage; one of the mechanisms involved is oxidative stress [4–8]. In this study the oxidative stress was evident by the increase in carbonyl content in renal cortex of GM-treated rats. Furthermore, it is known that the increase in ROS levels induces cytotoxicity due to a concerted action of oxygen- [4] and nitrogen-derived free radicals [55]. Moreover, we found that SAC effectively prevented the increase in carbonyl content in renal cortex of rats treated with GM + SAC, an effect that could be associated with the SAC antioxidant properties and/or with its ability to prevent the fall in antioxidant enzymes activity (Mn-SOD, GPx, and GR).

In rats treated with GM, the increase in urinary excretion of NAG and total protein, and the decrease in blood GPx activity, could be associated with necrosis of proximal tubules, the primary site of drug accumulation, and the partial protective effect of SAC on these parameters could be associated with the ability of SAC to partially ameliorate the tubular necrosis.

In this study, Cu,Zn-SOD activity was unchanged and Mn-SOD activity decreased in the GM group, which is in agreement with our previous data [14,17]. O_2^- and H_2O_2 could induce the inactivation of Mn-SOD, GPx, GR, and CAT in renal cortex from GM-treated rats. Also it is known is that peroxynitrite anions impair Mn-SOD [56] and GPx [57] activities, and that O_2^- inactivates GPx and CAT [58]. In addition, the decrease in CAT activity in GM-treated rats could be secondary to the decrease in the content of its protein and its mRNA [14]. SAC treatment almost completely inhibited the decrease in Mn-SOD, GPx, and GR activities, an effect that could be related to its ability to scavenge O_2^- [27].

Our results indicate that the increase in oxidative stress and the decrease in antioxidant enzymes Mn-SOD, GPx, GR, and CAT activity, could be factors involved in

the sequence of events leading to GM nephrotoxicity, and that the protective effect of SAC could be associated with the prevention of the increase in oxidative stress and the fall in the antioxidant enzymes activity.

The protective effect obtained in this work was similar to obtained in GM-treated rats and treated with garlic powder [14] or AGE [17]; however, the protective effect observed with SAC was higher than that obtained with garlic powder or AGE. Thus, in this work SAC was administered 24 h before GM, a shorter time interval than used previously with garlic powder [14] or AGE [17], a time interval that is more compatible to the clinical practice, although the simultaneous administration of both SAC and GM would be closer to the actual clinical setting. Therefore, this indicates that SAC may be clinically used as a drug to prevent the GM-induced ARF.

In conclusion, the protective effect of SAC on GM-induced nephrotoxicity was associated with the decrease in the oxidative stress and the preservation of Mn-SOD, GPx, and GR activities in renal cortex. The potential ability of SAC to reduce GM nephrotoxicity in patients remains to be studied.

Acknowledgements—This work was supported by CONACYT (#34920-M and #40009) and by PAEP (#203308). P.D.M. received a scholarship from CONACYT (#124981) and from DGAPA.

REFERENCES

- [1] Ali, B. H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen. Pharmacol.* **26**:1477–1487; 1995.
- [2] Edson, R. S.; Terrell, C. L. The aminoglycosides. *Mayo Clin. Proc.* **74**:519–528; 1999.
- [3] Lerner, S. A.; Schmitt, B. A.; Seligosohn, R.; Matz, G. J. Comparative study of ototoxicity and nephrotoxicity in patients randomly assigned to treatment with amikacin or gentamicin. *Am. J. Med.* **80**:98–104; 1986.
- [4] Cuzzocrea, S.; Mazzon, E.; Dugo, L.; Serraino, I.; Di Paola, R.; Britti, D.; De Sarro, A.; Pierpaoli, S.; Caputi, A.; Masini, E.; Salvemini, D. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **450**:67–76; 2002.
- [5] Guidet, B. R.; Shah, S. V. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am. J. Physiol.* **256**:F158–F164; 1989.
- [6] Sha, S. H.; Schacht, J. Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:341–347; 1999.
- [7] Walker, P. D.; Barri, Y.; Shah, S. V. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Ren. Fail.* **21**:433–442; 1999.
- [8] Yang, C. L.; Du, X. H.; Han, Y. X. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren. Fail.* **17**:21–26; 1995.
- [9] Nakajima, T.; Hishida, A.; Kato, A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am. J. Physiol.* **266**:F425–F431; 1994.
- [10] Ali, B. H. The effect of treatment with the medicinal plant *Rhazya stricta* decne on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* **9**:385–389; 2002.
- [11] Al-Majed, A. A.; Mostafa, A. M.; Al-Rikabi, A. C.; Al-Shabanah, O. A. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.* **46**:445–451; 2002.
- [12] Naidu, M. U.; Shifow, A. A.; Kumar, K. V.; Ratnakar, K. S. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* **7**:191–197; 2000.
- [13] Kumar, K. V.; Shifow, A. A.; Naidu, M. U.; Ratnakar, K. S. Carvedilol: a beta blocker with antioxidant property protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* **66**:2603–2611; 2000.
- [14] 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.
- [15] Mazzon, E.; Britti, D.; De Sarro, A.; Caputi, A. P.; Cuzzocrea, S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **424**:75–83; 2001.
- [16] Sener, G.; Sehirli, A. O.; Altunbas, H. Z.; Ersoy, Y.; Paskaloglu, K.; Arbak, S.; Ayanoglu-Dulger, G. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pineal Res.* **32**:231–236; 2002.
- [17] Maldonado, P. D.; Barrera, D.; Medina-Campos, O. N.; Hernández-Pando, R.; Ibarra-Rubio, M. E.; Pedraza-Chaverri, J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci.* In press; 2003.
- [18] Walker, P. D.; Shah, S. V. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J. Clin. Invest.* **81**:334–341; 1988.
- [19] Ali, B. H.; Bashir, A. K. Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Gen. Pharmacol.* **27**:349–353; 1996.
- [20] Ademuyiwa, O.; Ngaha, E. O.; Ubah, F. O. Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **9**:281–288; 1990.
- [21] Abdel-Naim, A. B.; Abdel-Wahab, M. H.; Attia, F. F. Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.* **40**:183–187; 1999.
- [22] Erdem, A.; Gundogan, N. U.; Usubutun, A.; Kilinc, K.; Erdem, S. R.; Kara, A.; Bozkurt, A. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**:1175–1182; 2000.
- [23] Ozbek, E.; Turkoz, Y.; Sahna, E.; Ozugurlu, F.; Mizrak, B.; Ozbek, M. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int.* **85**:742–746; 2000.
- [24] Sandhya, P.; Varalakshmi, P. Effect of liponic acid administration on gentamicin-induced lipid peroxidation in rats. *J. Appl. Toxicol.* **17**:405–408; 1997.
- [25] Lawson, L. D. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: Koch, H. P.; Lawson, L. D., eds. *Garlic. The science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1996:37–107.
- [26] Amagase, H.; Petesch, B. L.; Matsuura, H.; Kasuga, S.; Itakura, Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* **131**:955S–962S; 2001.
- [27] Kim, K. M.; Chun, S. B.; Koo, M. S.; Choi, W. J.; Kim, T. W.; Kwon, Y. G.; Chung, H. T.; Billiar, T. R.; Kim, Y. M. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.* **30**:747–756; 2001.
- [28] Yamasaki, T.; Li, L.; Lau, B. H. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother. Res.* **8**:408–412; 1994.
- [29] Numagami, Y.; Ohnishi, S. T. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J. Nutr.* **131**:1100S–1105S; 2001.
- [30] Numagami, Y.; Sato, S.; Ohnishi, S. T. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem. Int.* **29**:135–143; 1996.
- [31] Mostafa, M. G.; Mima, T.; Ohnishi, S. T. S-allylcysteine amelio-

- rates doxorubicin toxicity in the heart and liver in mice. *Planta Med.* **66**:148–151; 2000.
- [32] Kojima, R.; Toyama, Y.; Ohnishi, S. T. Protective effects of an aged garlic extracts on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. *Nutr. Cancer.* **22**:163–173; 1994.
- [33] Ho, S.; Ide, N.; Lau, B. H. S-allylcysteine reduces antioxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* **8**:39–46; 2001.
- [34] Ide, N.; Lau, B. H. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J. Pharm. Pharmacol.* **49**:908–911; 1997.
- [35] Ide, N.; Lau, B. H. S-allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **25**:619–624; 1999.
- [36] Ide, N.; Lau, B. H. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J. Nutr.* **131**:1020S–1026S; 2001.
- [37] Geng, Z.; Rong, Y.; Lau, B. H. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic. Biol. Med.* **23**:345–350; 1997.
- [38] Ide, N.; Nelson, A. B.; Lau, B. H. Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu^{2+} -induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med.* **63**:263–264; 1997.
- [39] Imai, J.; Ide, N.; Nagae, S.; Moriguchi, T.; Matsuura, H.; Itakura, Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* **60**:417–420; 1994.
- [40] Sumioka, I.; Matsura, T.; Kasuga, S.; Itakura, Y.; Yamada, K. Mechanisms of protection by S-allylmercaptocysteine against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **78**:199–207; 1998.
- [41] Lawson, L. D.; Wang, Z. J.; Hughes, B. G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp.: precursors of AGE-dependent *trans*-1-propenyl. *J. Nat. Prod.* **54**:436–444; 1991.
- [42] Owen, P. L.; Johns, T. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J. Ethnopharmacol.* **64**:149–160; 1999.
- [43] Nourooz-Zadeh, J.; Tajaddini-Sarmadi, J.; Wolff, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal. Biochem.* **220**:403–409; 1994.
- [44] Pedraza-Chaverri, J.; Cruz, C.; Tapia, E.; Peña, J. C. Activity of serum enzymes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Ren. Fail.* **14**:523–531; 1992.
- [45] Pedraza-Chaverri, J.; Granados-Silvestre, M. D.; Medina-Campos, O. N.; Maldonado, P. D.; Olivares-Corichi, I. M.; Ibarra-Rubio, M. E. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Mol. Cell. Biochem.* **216**:9–19; 2001.
- [46] Barrera, D.; Maldonado, P. D.; Medina-Campos, O. N.; Hernández-Pando, R.; Ibarra-Rubio, M. E.; Pedraza-Chaverri, J. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. *Free Radic. Biol. Med.* **34**:1390–1398; 2003.
- [47] Levine, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:790–796; 2002.
- [48] Pedraza-Chaverri, J.; Granados-Silvestre, M. D.; Medina-Campos, O. N.; Hernandez-Pando, R. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:245–253; 1999.
- [49] Dillon, S. A.; Lowe, G. M.; Billington, D.; Rahman, K. Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F(2 alpha) in smoking and nonsmoking men and women. *J. Nutr.* **132**:168–171; 2002.
- [50] Borek, C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.* **131**:1010S–1015S; 2001.
- [51] Nagae, S.; Ushijima, M.; Hatono, S.; Imai, J.; Kasuga, S.; Matsuura, H.; Itakura, Y.; Higashi, Y. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med.* **60**:214–217; 1994.
- [52] Duque, I.; García-Escribano, C.; Rodríguez-Puyol, M.; Díez-Marqués, M. L.; López-Novoa, J. M.; Arribas, I.; Hernando, L.; Rodríguez-Puyol, D. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am. J. Physiol.* **263**:F466–F473; 1992.
- [53] Martínez-Salgado, C.; Eleno, N.; Tavares, P.; Rodríguez-Barbero, A.; García-Criado, J.; Bolaños, J. P.; López-Novoa, J. M. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int.* **62**:1682–1692; 2002.
- [54] Rivas-Cabañero, L.; Rodríguez-López, A. M.; Martínez-Salgado, C.; Saura, M.; Lamas, S.; López-Novoa, J. M. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp. Nephrol.* **5**:23–30; 1997.
- [55] Augusto, O.; Bonini, M. G.; Amanso, A. M.; Linares, E.; Santos, C. C.; De Menezes, S. L. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**:841–859; 2002.
- [56] MacMillan-Crown, L. A.; Thompson, J. A. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **366**:82–88; 1999.
- [57] Padmaja, S.; Squadrito, G. L.; Pryor, W. A. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**:1–6; 1998.
- [58] Rister, M.; Baehner, R. L. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* **58**:1174–1184; 1976.

ABBREVIATIONS

- AGE—Aged garlic extract
 ARF—Acute renal failure
 BUN—Blood urea nitrogen
 GM—Gentamicin
 CAT—Catalase
 Cu,Zn-SOD—Copper/zinc-containing superoxide dismutase
 DDC—Diethyldithiocarbamic acid
 GPx—Glutathione peroxidase
 GR—Glutathione reductase
 GRF—Glomerular filtration rate
 H&E—Hematoxylin-eosin
 ^1H NMR— ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy
 HO—Hydroxyl radical
 H_2O_2 —Hydrogen peroxide
 Mn-SOD—Manganese-containing superoxide dismutase
 β -NADPH— β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
 NAG—p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide
 NBT—Nitroblue tetrazolium
 NO—Nitric oxide
 O_2^- —Superoxide anion
 ROS—Reactive oxygen species
 SAC—S-allylcysteine
 SAMC—S-allylmercaptocysteine
 SD—Standard deviation



Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats

Perla D. Maldonado^a, Diana Barrera^a, Omar N. Medina-Campos^a,
Rogelio Hernández-Pando^b, María E. Ibarra-Rubio^a, José Pedraza-Chaverri^{a,*}

^aDepartment of Biology, Faculty of Chemistry, Building B, 2nd Floor, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., Mexico

^bDepartment of Experimental Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", 14000, México, D.F., Mexico

Received 30 December 2002; accepted 1 April 2003

Abstract

Gentamicin (GM) is an antibiotic whose clinical use is limited by its nephrotoxicity. Experimental evidences suggest a role of reactive oxygen species in GM-induced nephrotoxicity. Therefore, we investigated if aged garlic extract (AGE), an antioxidant, has a protective role in this experimental model. Four groups of male Wistar rats were studied: 1) Control (CT), injected subcutaneously (s.c.) and intraperitoneally (i.p.) with saline, 2) GM, treated s.c. with GM (70 mg/kg/12 hours/4 days), 3) AGE, treated i.p. with AGE (1.2 mL/kg/12 hours/6 days), and 4) GM + AGE treated with GM and AGE. The treatment with AGE started two days before the first dose of GM (GM + AGE group) or saline (AGE group). Animals were sacrificed on day 5, and blood, urine, and kidneys were obtained. Nephrotoxicity was made evident by: 1) the increase in blood urea nitrogen and plasma creatinine, 2) the decrease in plasma glutathione peroxidase (GPx) activity and the urinary increase in N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity and total protein, and 3) necrosis of proximal tubular cells. These alterations were prevented or ameliorated by AGE treatment. Furthermore, AGE prevented the GM-induced increase in the renal levels of oxidative stress markers: nitrotyrosine and protein carbonyl groups and the decrease in manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), GPx, and glutathione reductase (GR) activities. The protective effect of AGE was associated with the decrease in the oxidative stress and the preservation of Mn-SOD, GPx,

* Corresponding author. Facultad de Química, Edificio "B", Segundo Piso, Lab. 209, Ciudad Universitaria, UNAM, 04510, México, D.F., Mexico. Tel./fax: +55-5622-35-15.

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

and GR activities in renal cortex. These data suggest that AGE may be a useful agent for the prevention of GM-nephrotoxicity.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Aged garlic extract; Garlic; Gentamicin; Aminoglycosides; Acute renal failure; Antioxidant enzymes; Oxidative stress; Nitrotyrosine; Nephrotoxicity; Reactive oxygen species; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase; Glutathione reductase

Introduction

Gentamicin (GM) is an aminoglycoside antibiotic widely used as an agent for the treatment of life-threatening gram-negative infections (Ali, 1995). However, the clinical usefulness of the drug is limited by the fact that 10–20% of the patients treated with GM for more than seven days show some signs of nephrotoxicity (Lerner et al., 1986). Despite the introduction of newer and less toxic antibiotics, GM continues playing a useful role in the treatment of serious enterococcal, mycobacterial, and gram-negative infections, due to its effectiveness against resistant β -lactamic microorganisms, its low cost, and the low levels of resistance among enterobacteriaceae family bacterium (Edson and Terrell, 1999). Therefore, a potential therapeutic approach to protect or reverse GM-induced renal damage would have very important clinical advantages. The exact mechanism by which GM induces nephrotoxicity is unknown; however, reactive oxygen species (ROS) appear to be involved (Guidet and Shah, 1989; Nakajima et al., 1994; Walker and Shah, 1987, 1988; Yang et al., 1995). It has been found that renal cortical lipoperoxidation (Nakajima et al., 1994), and renal hydrogen peroxide (H_2O_2) generation (Guidet and Shah, 1989) are increased in GM-treated rats. It has also been found that GM-induced renal damage is lowered by the dietary antioxidants vitamin E and selenium (Ademuyiwa et al., 1990), and our laboratory reported that a 2% garlic powder diet prevented oxidative stress and nephrotoxicity induced by GM (Pedraza-Chaverri et al., 2000). The 2% garlic powder was given 14 days in advance and along all GM-treatment, which is not compatible with clinical practice. In addition, many people refuse to take garlic powder or fresh garlic due to their pungent odor. Therefore we searched for an odorless garlic presentation with antioxidant properties. During garlic aging (up to 20 months) unstable and highly odorous compounds in fresh garlic are converted into more stable and much less odorous compounds (Amagase et al., 2001). This garlic preparation is known as aged garlic extract (AGE) whose chemical composition is different from that of garlic powder (Lawson, 1998). The most abundant compounds (mg/g product) in AGE are: alliin (0.3), γ -glutamylcysteines (0.34), γ -glutamyl-S-allylcysteines (0.25), S-allylcysteine (0.6), and S-allylmercaptocysteine (0.15), whereas in garlic powder the most abundant compounds are: alliin (11.5) and γ -glutamylcysteines (26) (Lawson, 1998). Moreover, it has been shown that AGE exhibits antioxidant properties *in vitro* (Borek, 2001; Ide and Lau, 1999; Kim et al., 2001; Yamasaki et al., 1994) and *in vivo* (Borek, 2001; Dillon et al., 2002). In addition, AGE is a commercially available garlic preparation that has been widely studied for its high antioxidant content and its health-protective potential (Borek, 2001; Ide and Lau, 1999, 2001; Kim et al., 2001; Morihara et al., 2002; Yamasaki et al., 1994). Taking into account all the AGE properties above described, in this work we studied the effect of AGE, an antioxidant, on the GM-induced renal damage.

Methods

Reagents

AGE was kindly provided by Wakunaga of America Co., Ltd. (Mission Viejo, CA, USA). GM was from Schering-Plough (Mexico City, México). Xanthine, xanthine oxidase, nitroblue tetrazolium (NBT), diethyldithiocarbamic acid (DDC), nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) and 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Rabbit anti-rat polyclonal antibodies against manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) and copper, zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) were from Stressgen Biotechnologies Co. (Victoria, BC, Canada). Rabbit anti-human catalase (CAT) polyclonal antibodies were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Enhanced chemiluminescence (ECL) kit for Western blot was purchased from Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, England). Rabbit anti-nitrotyrosine polyclonal antibodies were from Upstate (Lake Placid, NY, USA). All other chemicals were reagent grade.

Superoxide anion (O_2^-) scavenging activity of AGE *in vitro*

Xanthine-xanthine oxidase system was used to determine the O_2^- scavenging activity of AGE. O_2^- production and xanthine oxidase activity were measured as NBT reduction and uric acid production, respectively (Bielski et al., 1980) using a DU 64 Beckman spectrophotometer. Tubes without AGE were taken as 100% of NBT reduction.

Experimental design

Male Wistar rats (Harlan Teklad, Mexico City, Mexico) initially weighing 225–250 g were used. All animals had free access to water and commercial rodent diet (Harlan Teklad), and were randomly divided in four groups as follows ($n = 6$ rats per group): 1) Control (CT), injected subcutaneously (s.c.) and intraperitoneally (i.p.) with isotonic saline solution, 2) GM, treated with GM; 3) AGE, treated with AGE; and 4) GM + AGE, treated with GM and AGE. GM treated rats (GM and GM + AGE groups) received 70 mg of GM/kg body weight/12 hours s.c. for 4 days, and AGE treated rats (AGE and GM + AGE groups) received a dose of 1.2 mL of AGE/kg body weight/24 hours i.p. for 6 days (two days before the first dose of GM, in the GM group, or saline, in the CT group, and along the study). Rats were maintained in stainless steel metabolic cages with a 12-hour light:dark cycle to collect 24-hour urine. Urine was stored at $-40\text{ }^\circ\text{C}$ until N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity and total protein were measured. Animals were sacrificed on day 5, and blood was collected to obtain plasma which was stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until creatinine and blood urea nitrogen (BUN), markers of glomerular damage, and glutathione peroxidase (GPx) activity, a marker of tubular damage, were determined. One kidney was quickly removed to obtain cortex samples for measurement of GM concentration, histological studies, and immunohistochemical localization of nitrotyrosine, a marker of endogenous production of peroxynitrite. The other kidney was removed to obtain 0.1 g of renal cortex which was homogenized in a Polytron for 10 seconds in cold 50 mM potassium phosphate and 0.1% Triton X-100, pH = 7.0. The homogenate was centrifuged at $19,000 \times g$ and $4\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min. Supernatant was separated to measure total protein, and the activity of total superoxide dismutase (SOD), Mn-SOD, CAT, GPx, and glutathione reductase (GR). Another portion of this

kidney was used to measure protein carbonyl content, a relatively stable marker of protein oxidation by ROS.

The i.p. injection of AGE has been used successfully to ameliorate oxidative stress in experimental models in vivo (Kojima et al., 1994; Numagami et al., 1996). The dose of AGE used in this work is similar to that used by Numagami et al. (1996).

Markers of glomerular and tubular damage

Plasma creatinine and BUN were measured using commercial kits and total protein in urine was measured by a turbidimetric method (Pedraza-Chaverri et al., 1999). Urinary NAG activity was determined using p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide as substrate (Pedraza-Chaverri et al., 2000). Plasma GPx activity was measured using GR and NADPH in a coupled reaction (Pedraza-Chaverri et al., 2001).

Histological analysis

Kidney sections of 4 μ m of thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H and E) (Pedraza-Chaverri et al., 2000). The histological profile of twenty proximal tubules randomly selected per rat (5–6 rats per experimental group) was recorded using a Leica Qwin Image Analyzer (Cambridge, UK). The percentage of tubules with histopathological alterations like swelling, cytoplasmic vacuolization, desquamation or necrosis was calculated.

Oxidative stress markers

The immunohistochemical localization of nitrotyrosine was performed in sections of 4 μ m of thickness. Endogenous peroxidase was quenched/inhibited with 4.5% H_2O_2 . Sections were incubated with a 1:700 dilution of anti-nitrotyrosine antibody and then were incubated with a 1:250 dilution of a peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody for 1 hour, and finally incubated with H_2O_2 -DAB for 1 min (Barrera et al., 2003). Sections were counterstained with hematoxylin. Quantitative image analysis was performed with a Zeiss KS 300 Imaging System, Release 3.0 (Hallbergmoos, Germany). This software measures densitometric mean value of the region in different fields of the sections. We normalized the data (arbitrary units) to 1.0 in CT group (Barrera et al., 2003). Protein carbonyl groups in renal cortex were detected by its reactivity with 2,4-dinitrophenylhydrazine (Reznick and Packer, 1994).

Antioxidant enzymes in renal cortex

Total SOD activity was assayed by a previously reported method using NBT and Mn-SOD activity was measured by inhibiting Cu, Zn-SOD 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 (Pedraza-Chaverri et al., 1999, 2001). GPx activity was assayed as previously described (Pedraza-Chaverri et al., 2001) and GR activity was assayed according to Carlberg and Mannervik (1975) measuring the disappearance of NADPH.

Western blot

Immunodetection was performed using specific primary antibodies against Mn-SOD, Cu, Zn-SOD or CAT (Pedraza-Chaverri et al., 2001). The hybrids were visualized by chemiluminescence and quantified by densitometry using a software (Sigma ScanPro, version 4.0, San Rafael, CA, USA).

Renal GM content

GM concentration was measured in renal cortical homogenates by the fluorescence polarization immunoassay technology, by using the AxSYM^R gentamicin assay (Abbot Laboratories, Abbot Park, IL, USA).

Statistics

Data are presented as mean \pm SD and were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons using the software Prism 2.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Non-paired *t*-test was used to compare the quantitative histological data and renal GM content. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In vitro evaluation of the AGE scavenging properties

AGE scavenges O₂⁻ in a concentration-dependent manner. AGE significantly inhibited the NBT reduction for the concentrations shown in Table 1. Higher AGE concentrations interfered with uric acid production (data not shown).

Body weight and urinary volume

Body weight was not statistically different among the four groups along the study and on day 5 (Data not shown). On day 5, urinary volume increased significantly in the GM group (CT = 7.3 \pm 2 and

Table 1
Scavenging effect of AGE on superoxide radical generated from xanthine/xanthine oxidase/NBT system^{a,b}

AGE (mg/mL)	NBT reduction		Uric acid production	
	Δ OD ₅₆₀ /min	Inhibition (%)	Δ OD ₂₉₅ /min	Inhibition (%)
0.00	0.051 \pm 0.005	–	0.020 \pm 0.001	–
1.38	0.048 \pm 0.002	5.3 \pm 4.4	0.023 \pm 0.001	0.0
2.75	0.036 \pm 0.002	29.4 \pm 3.2*	0.022 \pm 0.004	0.0
5.51	0.024 \pm 0.001	51.7 \pm 2.5*	0.024 \pm 0.008	0.0

^a Values are mean \pm SD.

^b AGE, aged garlic extract; OD, optical density; NBT, nitroblue tetrazolium.

* $P < 0.001$ vs. AGE 0 mg/mL; $n = 5$.

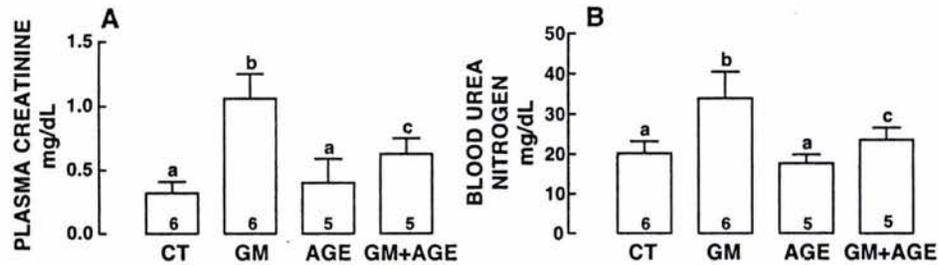


Fig. 1. Plasma creatinine (A) and blood urea nitrogen (B) on day 5 in the four groups of rats studied: CT: control group, GM: gentamicin group, AGE: aged garlic extract group, and GM + AGE: gentamicin + aged garlic extract group. The data represent the mean \pm SD. Different letter superscripts indicate statistically significant differences among groups ($P < 0.05$); $b > c > a$. n for each group is printed in its respective bar.

GM = 13.2 ± 4.6 mL, $P < 0.05$), and AGE was unable to prevent this increase in the GM + AGE group (GM + AGE = 10.1 ± 4.3 mL).

Markers of glomerular and tubular damage

Plasma creatinine and BUN increased 5.7 and 2.7-fold, respectively, in the GM group compared to the CT group (Fig. 1A and B). AGE partially prevented the increase in creatinine and BUN levels in the GM + AGE group. GM increased urinary excretion of NAG and total protein on days 2 and 4 (Fig. 2A and B), reaching the highest excretion on day 4 (4.9-fold for NAG and 2.6-fold for total protein). The increase in both parameters was partially prevented by AGE on day 4 and the increase in urinary protein excretion was partially prevented on day 2. Urinary NAG excretion in GM + AGE group on days 2 and 4 was not statistically different. Plasma GPx activity diminished to 50.3% in the GM group (Fig. 3) and the

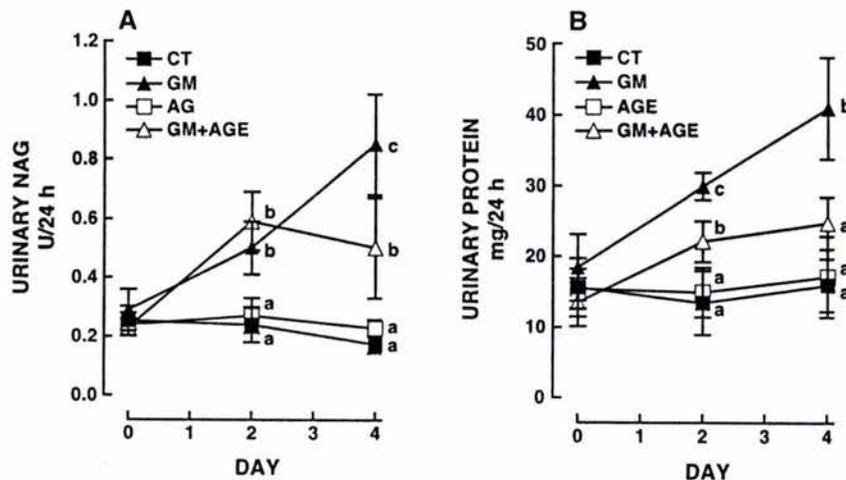


Fig. 2. Urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (A) and total protein (B) on day 5 in the four groups of rats studied. The data represent the mean \pm SD. Different letter superscripts indicate statistically significant differences among groups ($P < 0.01$) in the same day; $c > b > a$. $n = 5-6$.

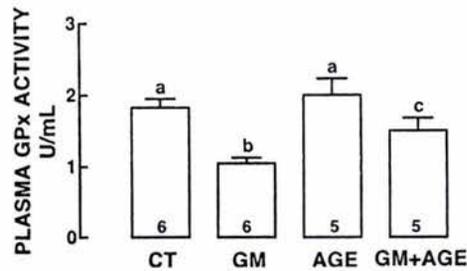


Fig. 3. Plasma glutathione peroxidase activity on day 5 in the four groups of rats studied. The data represent the mean \pm SD. Different letter superscripts indicate statistically significant differences among groups ($P < 0.001$); $a > c > b$. n for each group is printed in its respective bar.

treatment with AGE was able to partially prevent this reduction (GM + AGE group). Markers of glomerular and tubular damage were similar in CT and AGE groups.

Histological analysis

Rats treated with GM showed vacuolization and necrosis in the proximal tubular epithelial cells (Fig. 4, upper panel). The percentage of damaged tubules in the GM group was $98.5 \pm 2\%$ and the treatment with AGE significantly decreased this percentage to $71 \pm 9.5\%$ (GM + AGE group, $P < 0.0001$). There were no renal histological alterations in the CT and AGE groups (Fig. 4, upper panel).

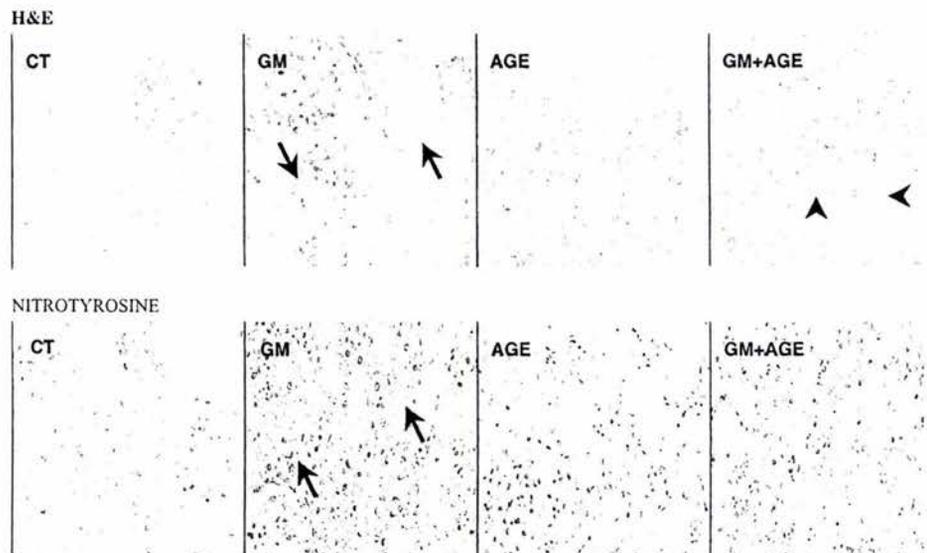


Fig. 4. Upper panel: Light microscopic findings in the renal cortex from CT, GM, AGE and GM + AGE groups. GM-treated rats showed necrosis (arrows) in the proximal tubular epithelial cells. Histological damage decreased in the GM + AGE group. Vacuolization is indicated by arrowheads. H and E. 200X. Lower panel: Representative immunohistochemistry for nitrotyrosine in the renal cortex from the four groups of rats studied on day 5. GM-treated rats revealed strong positive immunostaining in the proximal tubular epithelial cells (arrows), which was markedly decreased in the GM + AGE group. 200X.

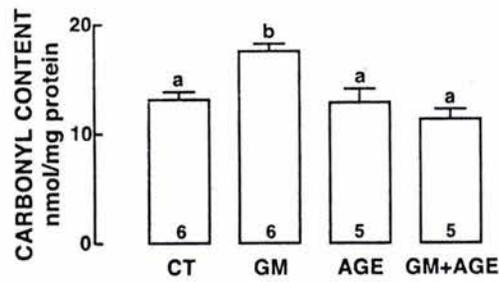


Fig. 5. Protein carbonyl content in the renal cortex from the four groups of rats studied on day 5. The data represent the mean \pm SD. Different letter superscripts indicate statistically significant differences among groups ($P < 0.001$); $b > a$. n for each group is printed in its respective bar.

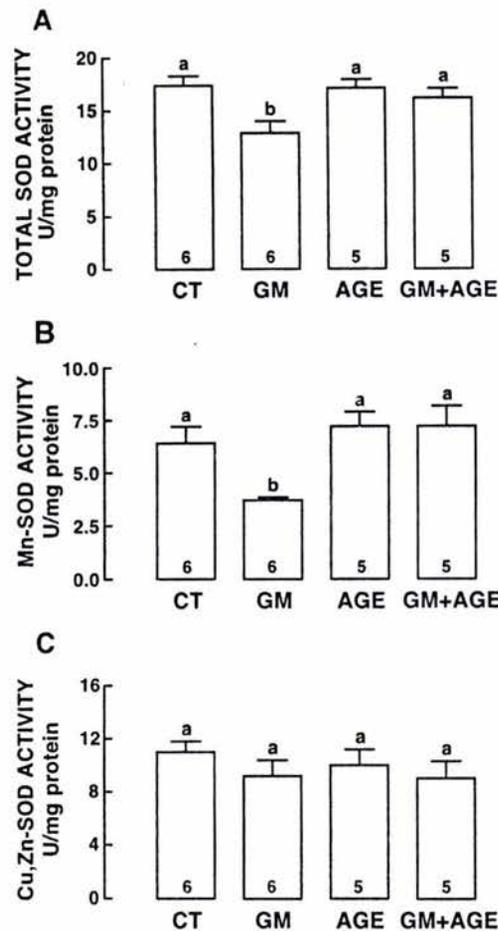


Fig. 6. Total superoxide dismutase (A), Mn superoxide dismutase (B), and Cu, Zn superoxide dismutase (C) activity in the renal cortex from the four groups of rats studied on day 5. The data represent the mean \pm SD. Different letter superscripts indicate statistically significant differences among groups ($P < 0.001$); $a > b$. n for each group is printed in its respective bar.

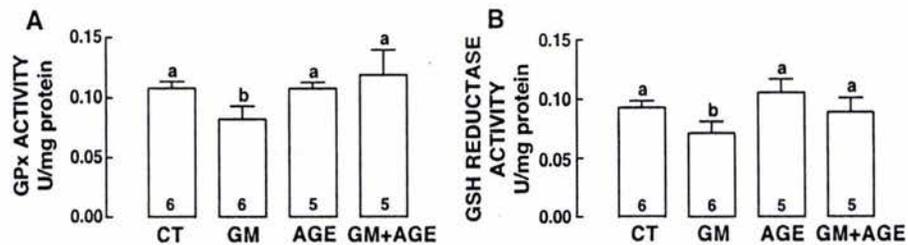


Fig. 7. Glutathione peroxidase (A) and glutathione reductase (B) activity in renal cortex on day 5 from the four groups of rats studied. The data represent the mean \pm SD. Different letter superscripts indicate statistically significant differences among groups ($P < 0.001$); $a > b$. n for each group is printed in its respective bar.

Oxidative stress markers

Immunohistochemical localization revealed positive immunostaining in the proximal tubular epithelial cells from GM-treated rats (Fig. 4, lower panel). AGE clearly diminished nitrotyrosine staining in renal cortex from GM + AGE group. The quantitative image analysis shows an increment of 1.5 times in nitrotyrosine content in GM group compared to CT group (2.5 ± 0.27 , $P < 0.001$). Nitrotyrosine content in GM + AGE group was significantly lower (1.9 ± 0.21 , $P < 0.001$) than in GM group. Immunostaining for nitrotyrosine in CT and AGE groups was similar (Fig. 4, lower panel).

GM treatment induced a 47% increase in the protein carbonyl content in renal cortex compared to the CT group (Fig. 5). The increase induced by GM was completely prevented by AGE (GM + AGE group). Protein carbonyl content was similar in CT and AGE groups.

Antioxidant enzymes

Total SOD activity diminished 24% in the GM group compared to CT group (Fig. 6A). This decrease is due to the Mn-SOD, which diminished 42.2% in the GM group (Fig. 6B). AGE completely prevented the decrease in total SOD and Mn-SOD activity in the GM + AGE group. Cu, Zn-SOD remained unaffected by the GM-treatment (Fig. 6C). GPx and GR activities decreased 38.5% and 23.7%, respectively in GM-treated rats (Fig. 7). These decreases were prevented by AGE in the GM + AGE group. Mn-SOD and Cu, Zn-SOD (Table 2) content, measured by Western blot, were unchanged in the

Table 2

Densitometric analysis of Western blot of Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, and CAT in renal cortex from the four groups of rats studied on day 5^{a,b,c}

	CT	GM	AGE	GM + AGE
Mn-SOD	100 \pm 6	103 \pm 15	102 \pm 5	95 \pm 11
Cu, Zn-SOD	100 \pm 8	97 \pm 14	99 \pm 10	99 \pm 8
CAT	100 \pm 9	67 \pm 15*	95 \pm 16	75 \pm 12*

^a Values are mean \pm SD.

^b CT, control; GM gentamicin; AGE, aged garlic extract; Mn-SOD, manganese superoxide dismutase; Cu, Zn-SOD, copper, zinc superoxide dismutase; CAT, catalase.

^c Data are expressed as % of CT group.

* $P < 0.01$ vs. CT group; $n = 5-6$.

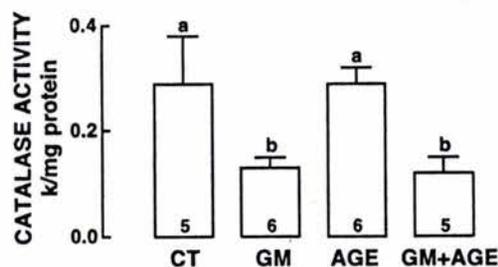


Fig. 8. Catalase activity in renal cortex on day 5 from the four groups of rats studied. The data represent the mean \pm SD. Different letter superscripts indicate statistically significant differences among groups ($P < 0.001$); $a > b$. n for each group is printed in its respective bar.

four groups of rats studied. CAT activity (Fig. 8) and content (Table 2) decreased 44.8% and 32.6%, respectively in rats treated with GM. AGE was unable to prevent the decrease in both parameters (GM + AGE group). Total SOD, Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, GPx, GR, and CAT activities were similar in CT and AGE groups (Figs. 6A,B,C, 7A,B, and 8).

Renal GM content

Treatment with AGE had no effect on renal cortical GM content at the end of the study: 47.5 ± 12 in GM group ($n = 6$) vs. 51.6 ± 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein in GM + AGE group ($n = 5$, $P = \text{NS}$).

Discussion

The exact mechanism by which GM induces the renal damage is unknown, however, several agents that scavenge or interfere with ROS production successfully ameliorate GM-induced nephropathy (Ademuyiwa et al., 1990; Ali, 2002; Ali and Bashir, 1996; Al-Majed et al., 2002; Cuzzocrea et al., 2002; Erdem et al., 2000; Mazzon et al., 2001; Naidu et al., 2000; Nakajima et al., 1994; Pedraza-Chaverri et al., 2000; Sener et al., 2002). In a previous work, we found that a 2% garlic powder diet prevented the GM induced nephrotoxicity, which was associated with the antioxidant properties of garlic (Pedraza-Chaverri et al., 2000). However, the amount of garlic powder that a person should eat to reproduce the same experimental conditions described in the previous work (Pedraza-Chaverri et al., 2000) is huge and, in general terms, not practical. In addition, the pungent garlic odor explains why many people refuse to take garlic. Therefore, in this work we evaluated the possible protective effect of AGE, an odorless garlic presentation, which is also less irritant and is a well-known antioxidant (Borek, 2001; Dillon et al., 2003; Ide and Lau, 1999; Kim et al., 2001; Yamasaki et al., 1994) on the GM-induced nephrotoxicity. In this work we administered AGE 2 days before GM, a lower time interval than that used previously with the 2% garlic powder diet, making it compatible in the clinical practice.

AGE partially prevented the increase in plasma creatinine and BUN (glomerular damage markers) induced by GM-treatment. Since glomeruli structure is normal in GM-treated rats (Pedraza-Chaverri et al., 2000), the decrease in glomerular function may not be attributed to structural damage. It has been found that the GM-treatment increases H_2O_2 (Guidet and Shah, 1989; Walker and Shah, 1987; Yang et al., 1995) and O_2^- (Cuzzocrea et al., 2002) production, and it is known that H_2O_2 (Duque et al., 1992) and O_2^-

(Martínez-Salgado et al., 2002) induce mesangial cells contraction, altering the filtration surface area and modifying the ultrafiltration coefficient factors, that decrease the glomerular filtration rate (GFR). Moreover, the decrease in Mn-SOD activity favors the increase in O_2^- concentration, and this radical can react with nitric oxide (NO, a vasodilator) to form peroxynitrite, a cytotoxic oxidant radical specie. The inactivation of NO by O_2^- could also lead to a decrease in the GFR (Rivas-Cabañero et al., 1997). These data indicate that the H_2O_2 and O_2^- could be involved in the decrease of GFR in GM-induced nephrotoxicity, and that the protective effect of AGE, could be related with its ability to scavenge O_2^- (Table 1) (Borek, 2001; Kim et al., 2001) and H_2O_2 (Borek, 2001; Ide and Lau, 1999), and/or with its ability to totally prevent the decrease in Mn-SOD activity (Fig. 6). Additionally, Morihara et al. (2002) found that AGE increases NO production, which also can help to prevent the decrease in the GRF.

Tubular damage was evaluated by measuring plasma GPx activity and the urinary excretion of NAG and total protein. In rats treated with GM, the increase in urinary NAG and total protein excretion, and the decrease in plasma GPx activity, could be associated with the necrosis of proximal tubules, the primary site of drug accumulation. Especially considering that GPx is synthesized almost exclusively in proximal tubular cells (Pedraza-Chaverri et al., 2000). AGE partially prevented these alterations induced by GM, and this prevention could be associated with the ability of AGE to partially ameliorate the tubular necrosis.

It has been suggested that the oxidative stress induces tubular damage (Cuzzocrea et al., 2002; Guidet and Shah, 1989; Walker and Shah, 1988; Yang et al., 1995). In this study, the carbonyl and nitrotyrosine content showed an increase in oxidative stress in rats. It is known that the increase in ROS levels induces cytotoxicity due to a concerted action of oxygen- (Cuzzocrea et al., 2002) and nitrogen-derived free radicals (Mazzon et al., 2001). Furthermore, we found that AGE prevented the increase in carbonyl and nitrotyrosine levels in renal cortex of rats treated with GM + AGE, effect that could be associated with the antioxidant properties of AGE, and with its ability to prevent the decrease in antioxidant enzymes activity (Mn-SOD, GPx and GR).

It is known that peroxynitrite anions impair Mn-SOD (MacMillan-Crow and Thompson, 1999) and GPx (Padmaja et al., 1998) activity and O_2^- inactivates GPx (Blum and Fridovich, 1985; Rister and Baehner, 1976) and CAT (Rister and Baehner, 1976). In this study, the decrease in Mn-SOD activity in the GM group was independent from Mn-SOD protein content. Cu, Zn-SOD activity was unchanged, perhaps due to the fact that Mn-SOD is more labile than Cu, Zn-SOD (Pedraza-Chaverri et al., 2000). The decrease in CAT activity is due to protein content and mRNA decreases in rats treated with GM (Pedraza-Chaverri et al., 2000). AGE-treatment totally prevented the decrease in Mn-SOD, GPx and GR activities, effect that could be related to its ability to scavenge O_2^- (Table 1) (Borek, 2001; Kim et al., 2001). The decrease in O_2^- levels would lead to the decrease of peroxynitrite levels, which is supported by the decrease in nitrotyrosine content in the GM + AGE group (Fig 4, lower panel). AGE was unable to prevent the decrease in CAT activity probably because the decrease is not only due to enzyme inactivation but also to decreased enzyme quantity and mRNA content.

Our results indicate that the increase in oxidative stress, and the decrease in antioxidant enzymes Mn-SOD, GPx, GR, and CAT activity, could be factors involved in the sequence of events leading to GM-nephrotoxicity. Also the protective effect of AGE could be associated with its ability to prevent the increase in oxidative stress and the decrease in the antioxidant enzymes activity (Mn-SOD, GPx, and GR), observed in renal cortex of rats treated with GM. Additionally, since AGE is a complex mixture of phytochemicals (Lawson, 1998), other potential mechanisms such as the ability of AGE to enhance glutathione content (Wang et al., 1999) and to chelate metals (Dillon et al., 2003) could be involved in its

protective effect on GM-induced nephrotoxicity. In fact, it is known that GM induces iron mobilization from renal cortical mitochondria (Ueda et al., 1993) and that deferoxamine, an iron chelator, is able to prevent GM-induced nephrotoxicity (Walker and Shah, 1988).

The protective effect of AGE on GM-induced nephrotoxicity suggests that AGE contains compounds that could potentially ameliorate GM-induced acute renal failure in rats. The AGE is a commercially available garlic presentation which has been used in healthy volunteers (Dillon et al., 2002) and whose composition has been reported (Lawson, 1998). It has been postulated that the compounds responsible of its protective effect are S-allylcysteine (Borek, 2001; Kim et al., 2001; Numagami and Ohnishi, 2001; Yamasaki et al., 1994), S-allylmercaptocysteine (Borek, 2001), and alliin (Kourounakis and Rekka, 1991) which are water soluble, odorless, and have antioxidant properties.

Conclusion

Our data indicate that AGE is a potent antioxidant both in vitro and in vivo. The antioxidant effect in vivo may explain, at least in part, the protective effect of AGE in rats with GM-nephrotoxicity. The potential ability of AGE to reduce GM-nephrotoxicity in patients remains to be studied.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT (#34920-M and #40009-M) and by PAEP (#203308). PDM received a scholarship from CONACYT (#124981) and from DGAPA. We thank QFB Romelia Velasco and QFB Tere Murguía of Instituto Nacional de Pediatría for the measurement of renal cortical gentamicin concentration.

References

- Ademuyiwa, O., Ngaha, E.O., Ubah, F.O., 1990. Vitamin E and selenium in gentamicin nephrotoxicity. *Humand and Experimental Toxicology* 9 (5), 281–288.
- Ali, B.H., 1995. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *General Pharmacology* 26 (7), 1477–1487.
- Ali, B.H., Bashir, A.K., 1996. Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *General Pharmacology* 27 (2), 349–353.
- Ali, B.H., 2002. The effect of treatment with the medicinal plant *Rhazya stricta* decne on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* 9 (5), 385–389.
- Al-Majed, A.A., Mostafa, A.M., Al-Rikabi, A.C., Al-Shabanah, O.A., 2002. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research* 46 (5), 445–451.
- Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y., 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition* 131 (3s), 955S–962S.
- 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.
- Bielski, B.H., Shlue, G.G., Bajuk, S., 1980. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2^- and O_2^- radicals. *Journal of Physical Chemistry* 84 (8), 830–833.

- Blum, J., Fridovich, I., 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240 (2), 500–508.
- Borek, C., 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition* 131 (3s), 1010S–1015S.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250 (14), 5475–5480.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Di Paola, R., Britti, D., De Sarro, A., Pierpaoli, S., Caputi, A., Masini, E., Salvemini, D., 2002. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *European Journal of Pharmacology* 450 (1), 67–76.
- Dillon, S.A., Lowe, G.M., Billington, D., Rahman, K., 2002. Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F(2 alpha) in smoking and nonsmoking men and women. *Journal of Nutrition* 132 (2), 168–171.
- Dillon, S.A., Burmi, R.S., Lowe, G.M., Billington, D., Rahman, K., 2003. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sciences* 72 (14), 1583–1594.
- Duque, I., García-Escribano, C., Rodríguez-Puyol, M., Díez-Marqués, M.L., López-Novoa, J.M., Arribas, I., Hernando, L., Rodríguez-Puyol, D., 1992. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *American Journal of Physiology* 263 (3 Pt. 2), F466–F473.
- Edson, R.S., Terrell, C.L., 1999. The aminoglycosides. *Mayo Clinic Proceedings* 74 (5), 519–528.
- Erdem, A., Gundogan, N.U., Usubatun, A., Kilinc, K., Erdem, S.R., Kara, A., Bozkurt, A., 2000. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrology Dialysis and Transplantation* 15 (8), 1175–1182.
- Guidet, B.R., Shah, S.V., 1989. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *American Journal of Physiology* 256 (1 Pt. 2), F158–F164.
- Ide, N., Lau, B.H., 1999. Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine* 6 (2), 125–131.
- Ide, N., Lau, B.H., 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *Journal of Nutrition* 131 (3s), 1020S–1026S.
- Kim, K.M., Chun, S.B., Koo, M.S., Choi, W.J., Kim, T.W., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Billiar, T.R., Kim, Y.M., 2001. Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radical Biology and Medicine* 30 (7), 747–756.
- Kojima, R., Toyama, Y., Ohnishi, S.T., 1994. Protective effects of an aged garlic extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. *Nutrition Cancer* 22 (2), 162–173.
- Kourounakis, P.N., Rekkas, E.A., 1991. Effect on active oxygen species of alliin and allium sativum (garlic) powder. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 74 (2), 249–252.
- Lawson, L.D., 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: Lawson, L.D., Bauer, R. (Eds.), *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. ACS Symposium Series, vol. 691. American Chemical Society, Washington, pp. 176–209.
- Lerner, S.A., Schmitt, B.A., Seligsohn, R., Matz, G.J., 1986. Comparative study of ototoxicity and nephrotoxicity in patients randomly assigned to treatment with amikacin or gentamicin. *American Journal of Medicine* 80 (6B), 98–104.
- MacMillan-Crow, L.A., Thompson, J.A., 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366 (1), 82–88.
- Martínez-Salgado, C., Eleno, N., Tavares, P., Rodríguez-Barbero, A., García-Criado, J., Bolaños, J.P., López-Novoa, J.M., 2002. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney International* 62 (5), 1682–1692.
- Mazzon, E., Britti, D., De Sarro, A., Caputi, A.P., Cuzzocrea, S., 2001. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *European Journal of Pharmacology* 424 (1), 75–83.
- Morihara, N., Sumioka, I., Moriguchi, T., Uda, N., Kyo, E., 2002. Aged garlic extract enhances production of nitric oxide. *Life Sciences* 71 (5), 509–517.
- Naidu, M.U., Shifow, A.A., Kumar, K.V., Ratnakar, K.S., 2000. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* 7 (3), 191–197.
- 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.
- Numagami, Y., Sato, S., Ohnishi, S.T., 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochemistry International* 29 (2), 135–143.

- Numagami, Y., Ohnishi, S.T., 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *Journal of Nutrition* 131 (3s), 1100S–1105S.
- Padmaja, S., Squadrito, G.L., Pryor, W.A., 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349 (1), 1–6.
- Pedraza-Chaverri, J., Granados-Silvestre, M.A., 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., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Olivares-Corichi, I.M., Granados-Silvestre, M.A., Hernández-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., 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.
- Reznick, A.Z., Packer, L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* 233, 357–363.
- Rister, M., Baehner, R.L., 1976. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *Journal of Clinical Investigation* 58 (5), 1174–1184.
- Rivas-Cabañero, L., Rodríguez-López, A.M., Martínez-Salgado, C., Saura, M., Lamas, S., López-Novoa, J.M., 1997. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Experimental Nephrology* 5 (1), 23–30.
- Sener, G., Sehirlı, A.O., Altunbas, H.Z., Ersoy, Y., Paskaloglu, K., Arbak, S., Ayanoglu-Dulger, G., 2002. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Pineal Research* 32 (4), 231–236.
- Ueda, N., Guidet, B., Shah, S.V., 1993. Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *American Journal of Physiology* 265 (3 Pt. 2), F435–F439.
- Walker, P.D., Shah, S.V., 1987. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *American Journal of Physiology* 253 (4 Pt. 1), C495–C499.
- Walker, P.D., Shah, S.V., 1988. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Journal of Clinical Investigation* 81 (2), 334–341.
- Wang, B.H., Zuzel, K.A., Rahman, K., Billington, D., 1999. Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 132 (2–3), 215–225.
- Yamasaki, T., Li, L., Lau, B.H., 1994. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytotherapy Research* 8 (7), 408–412.
- Yang, C.L., Du, X.H., Han, Y.X., 1995. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Renal Failure* 17 (1), 21–26.