



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR
D - SERINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

JESSICA VILLASEÑOR ARELLANOS



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D.F.

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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ
Vocal	Prof. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Secretario	Prof. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
1er. Suplente	Prof. ALEJANDRO ORTÍZ OSORNIO
2° Suplente	Prof. JUAN GABRIEL NAVARRETE VÁZQUEZ

Este trabajo se realizó en el laboratorio 209 del departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto 40009-M de CONACYT

Asesor: Dr. José Pedraza Chaverri

Supervisor técnico: Dra. Diana Barrera Oviedo

Sustentante: Jessica Villaseñor Arellanos



Three handwritten signatures are present on the right side of the page, each written over a horizontal line. The top signature is the most legible and appears to be 'Pedraza'. The middle signature is less legible but appears to be 'Barrera'. The bottom signature is highly stylized and illegible.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por dejarme llegar hasta aquí y por llenar mi vida de personas maravillosas y grandes oportunidades.

A mi mami, por ser mi mejor amiga y mi apoyo en cada paso que doy, por aconsejarme y hacerme ver las cosas tal como son y no como las quiero ver. Gracias por tu fe mamita, eres la mujer más admirable que conozco y mi modelo a seguir en todos los aspectos de mi vida. Te amo.

A mi papi, por darme tanto de su tiempo, por ser parte importante en mis proyectos y por enseñarme que hay que luchar con todo por lo que uno quiere. Te amo papi.

A mi hermanita, que es un ejemplo de entereza y que me ha enseñado que no importa si las cosas no van del todo bien, siempre es más fácil enfrentarte a la vida con una sonrisa y fuerza en el corazón.

A Rafael, que le ha dado sentido y luz a mi vida y que me ha enseñado lo que es amar. Gracias por comprenderme como lo haces, gracias por tu apoyo, por tu tiempo, por todo lo hermoso que me das y lo que he vivido junto a ti, por ayudarme a crecer...eres un hombre maravilloso en todo sentido y el amor de mi vida.

A mi tía Damiana, que siempre será como una madre para mí, gracias por tu apoyo y tu amor, te quiero mucho Pami.

A mi prima Olga Lidia que siempre ha estado conmigo para escucharme, apoyarme y aconsejarme y ha sido como otra hermana para mí, te quiero mucho Topo Gigia.

A mi primo Omar. Gracias por compartir conmigo tu visión de la vida, por ser mi amigo y sobre todo por presentarme a Rafa (ji). Te quiero mucho, primo.

A todo el resto de mi familia, gracias por ser tan unidos, por estar conmigo y por compartir mis logros. A mis abuelitas, que aunque ya no están aquí dejaron conmigo sus enseñanzas y amor. Al incordio y a Mayra, gracias por ser como son y por los momentos juntas.

A toda la banda de la facultad: las brujas Karla, Lilia y Marisol; Alonso, Ricardo, Raúl, Edgar, Beto, Paty, Jacob, Blanca, Caro, Erika, la Pinkys y todos los que me faltan, gracias por todos los buenos momentos juntos.

A todos los compañeros del laboratorio 209, es especial a Diana, Perla y Omar por todo el apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Pedraza, muchísimas gracias por el apoyo incondicional y la comprensión que me brindó desde que nos conocimos, por ser un ejemplo de disciplina, tenacidad y amor por su trabajo.

RESUMEN

Antecedentes. La D-serina es un aminoácido nefrotóxico, capaz de causar necrosis difusa en los segmentos S3, localizados en la porción recta de los túbulos proximales del riñón. A pesar de que el daño causado por este compuesto se conoce ya desde hace varios años, pocos estudios se han realizado para vislumbrar los mecanismos involucrados en el mismo.

Objetivo. Conocer la evolución de la nefrotoxicidad inducida por D-serina e investigar si ésta se asocia a estrés oxidativo y/o nitrosativo y si se presenta alteración en la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

Metodología. Se usaron ratas macho de la cepa Wistar, en un rango de peso de 250-300 g. La nefrotoxicidad se indujo con una sola aplicación de D-serina vía intraperitoneal a una dosis de 400 mg/kg de peso. Se evaluaron dos grupos: i) Control (L-ser), que recibió L-serina a una dosis de 400 mg/kg de peso y ii) D-serina (D-ser), que recibió una dosis de D-serina de 400 mg/kg. En este estudio se manejaron dos protocolos distintos: i) el de 5 días (sacrificio el día 5), con el fin de conocer la evolución de la nefrotoxicidad por D-serina; y ii) el de 24 horas (sacrificio el día 1). Para los dos protocolos se manejaron los dos grupos (CT y D-serina) antes mencionados, de 6 animales cada uno. Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas durante ambos protocolos con el propósito de recolectar la orina de los días 0,1,2,3,4,5 (protocolo de 5 días) y de los días 0 y 1 (protocolo de 24 horas). Los parámetros utilizados como marcadores para evaluar el daño renal tubular fueron: proteínas urinarias totales (proteinuria), excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y actividad de glutatión peroxidasa en suero (pGPx). Los marcadores utilizados para evaluar el daño glomerular fueron: concentración y depuración de creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN). Se extrajeron los dos riñones de cada animal para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal [catalasa (CAT), glutatión peroxidasa citosólica (cGPx), glutatión reductasa (GSH-Rx) y superóxido dismutasa (SOD) total] y para la realización de estudios histológicos [tinción con hematoxilina y eosina (H&E)] e inmunohistoquímicos, como proteínas nitradas [3-nitro-L-tirosina (3-NT)] y lipoperoxidación [4-hidroxi-2-nonanal (4-HNE)].

Resultados. Se encontró que en el protocolo de 5 días, la administración de D-serina provocó, además de un aumento en el volumen urinario (significativo en los días 3 y 4), cambios en los parámetros de daño tubular, como aumento en la excreción de proteínas totales en orina (significativo en los días 1 y 2) y en la actividad de la enzima NAG (significativo en los días 1, 2 y 3), así como una disminución ligera en la actividad de pGPx. En cuanto a los marcadores de daño glomerular, tanto la concentración de creatinina en suero como el BUN aumentaron de manera significativa, mientras que la depuración de creatinina disminuyó con la administración de D-serina. La actividad en corteza renal de las enzimas CAT, GSH-Rx y SOD total disminuyó significativamente para en el grupo tratado con D-serina respecto al grupo control.

En el protocolo de 24 horas, la administración de D-serina provocó aumento en el volumen urinario y cambios significativos en los siguientes parámetros de daño tubular: aumento muy marcado tanto en la excreción de proteínas totales en orina como en la actividad de la enzima NAG, así como una disminución en la actividad de pGPx respecto al grupo tratado con L-serina. En la tinción con H&E realizada en los cortes renales de este protocolo se observa un marcado daño (vacuolización y necrosis) en el grupo tratado con D-serina respecto al grupo control. Así mismo, en la tinción inmunohistoquímica de 3-NT, se observa una reacción positiva mucho más intensa para el grupo de D-serina que para el control, lo que sugiere la presencia de proteínas nitradas como resultado del estrés nitrosativo provocado por la administración de la D-serina. Los resultados que se obtuvieron para la tinción de 4-HNE son similares, pues se aprecia una reacción positiva predominante y mucho más intensa en el grupo de D-serina, lo que indica la presencia de residuos de la lipoperoxidación provocada por el estrés oxidativo. En cuanto a los marcadores de daño glomerular, tanto la concentración de creatinina en suero como el BUN aumentaron significativamente con la administración de D-serina, y dicho grupo también presentó una disminución muy marcada en la depuración de creatinina. La actividad de las enzimas en corteza

renal disminuyó en el grupo tratado con D-serina respecto al grupo control. Dicha disminución fue significativa para CAT y GSH-Rx.

Conclusión. Las evidencias inmunohistoquímicas (protocolo de 24 horas) y la disminución de la actividad de las principales enzimas antioxidantes en los grupos tratados con D-serina en ambos protocolos permiten concluir que el estrés oxidativo y nitrosativo pueden estar asociados al mecanismo de nefrotoxicidad por D-serina.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. D-serina y nefrotoxicidad	1
1.2. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	4
1.2.1. Anión superóxido	5
1.2.2. Peróxido de hidrógeno	6
1.2.3. Radical hidroxilo	6
1.2.3.1. Formación de 4-hidroxi-2-nonenal	7
1.3. Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	9
1.3.1. Formación de 3-nitrotirosina	10
1.4. Mecanismos antioxidantes de defensa contra las ERO	10
1.4.1. Antioxidantes enzimáticos	10
1.4.1.1. Superóxido dismutasa	10
1.4.1.2. Catalasa	11
1.4.1.3. Glutación peroxidasa	11
1.4.1.4. Glutación reductasa	12
1.5. Generalidades del riñón	13
1.5.1. Insuficiencia renal aguda	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVO GENERAL	18
4.1. Objetivos particulares	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1. Reactivos	19
5.2. Animales	19
5.3. Tratamiento de los animales	19
5.4. Obtención de las muestras	20
5.5. Determinaciones	21
5.5.1. Actividad de <i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminidasa en orina	21
5.5.2. Excreción de proteínas totales en orina	22
5.5.3. Creatinina en suero y orina	23
5.5.4. Glutación peroxidasa (cGPx y pGPx)	24
5.5.5. Histología	25
5.5.6. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	25
5.5.7. Catalasa	26
5.5.8. Glutación reductasa	26
5.5.9. Superóxido dismutasa	27
5.5.10. Inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE	27
5.6. Análisis estadístico	28

6. RESULTADOS	29
6.1. Protocolo de 5 días	29
6.1.1. Peso corporal	29
6.1.2. Volumen urinario	29
6.1.3. Parámetros de daño tubular	30
6.1.3.1. Actividad de NAG en orina	30
6.1.3.2. Excreción de proteínas totales en orina	31
6.1.3.3. Actividad de GPx en suero	31
6.1.4. Parámetros de daño glomerular	32
6.1.4.1. BUN	32
6.1.4.2. Creatinina en suero	32
6.1.4.3. Depuración de creatinina	33
6.1.5. Actividad de enzimas antioxidantes en corteza renal	33
6.1.5.1. Actividad de CAT	33
6.1.5.2. Actividad de GPx	34
6.1.5.3. Actividad de GSH-Rx	34
6.1.5.4. Actividad de SOD total	35
6.2. Protocolo de 24 horas	35
6.2.1. Peso corporal	36
6.2.2. Volumen urinario	36
6.2.3. Parámetros de daño tubular	37
6.2.3.1. Actividad de NAG en orina	37
6.2.3.2. Excreción de proteínas totales en orina	37
6.2.3.3. Actividad de GPx en suero	38
6.2.4. Histología	38
6.2.5. Parámetros de daño glomerular	39
6.2.5.1. BUN	39
6.2.5.2. Creatinina en suero	39
6.2.5.3. Depuración de creatinina	40
6.2.6. Actividad de enzimas antioxidantes en corteza renal	40
6.2.6.1. Actividad de CAT	40
6.2.6.2. Actividad de GPx	41
6.2.6.3. Actividad de GSH-Rx	41
6.2.6.4. Actividad de SOD total	42
6.2.7. Inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE	42
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES	48
9. REFERENCIAS	49

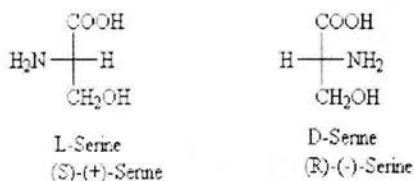
1. INTRODUCCIÓN

1.1 D-serina (D-ser) y nefrotoxicidad.

La D-serina es un aminoácido que ha sido localizado de manera natural en el cerebro de algunos mamíferos. En ratas, este aminoácido está íntimamente relacionado con los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), pues actúa como un potente agonista de ellos tanto *in vivo* como *in vitro* y por ello se presume es un moderador intrínseco de dichos receptores en el cerebro (1).

También se ha detectado su presencia en otros tejidos (aunque en menor concentración), en orina de mamíferos y como constituyente normal del plasma sanguíneo de ratón y humano, representando del 0.5-3% de la serina plasmática total en estado fisiológico normal, valor que se incrementa hasta un 23% en estados de insuficiencia renal crónica (IRC). Esta diferencia sugiere que el riñón es uno de los órganos encargados de mantener bajo el nivel de D-serina, probablemente mediante la oxidasa de D-aminoácidos (D-AAO), flavoenzima descubierta en 1935 por Hans Krebs y que en humanos se ha encontrado distribuida en cerebro y riñón (3).

La D-serina puede provenir de la racemización directa de la L-serina por medio de la enzima serina racemasa, pues se han llevado a cabo estudios en los que se reporta la transformación de L-serina (marcada radiactivamente) en D-serina en ratas intactas y también se ha observado actividad de la enzima en gusanos de seda en fracciones de homogenados purificadas parcialmente con sulfato de amonio (3,4). Las estructuras de la L y D-serina se encuentran a continuación (Esquema 1):



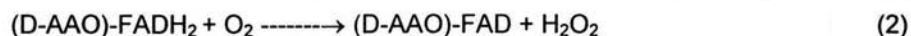
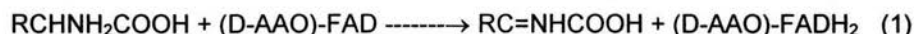
Esquema 1. Estructuras de L-serina y D-serina

La serina racemasa es una enzima predominantemente soluble que contiene 339 aminoácidos y tiene un peso molecular alrededor de los 36.3 kDa. Cercano al extremo amino se encuentra una secuencia consenso para un sitio de unión a piridoxal-5-fosfato, lo que sugiere que la serina racemasa es una enzima dependiente de dicho compuesto. Los análisis de western blot han revelado que los niveles de serina racemasa son altos en cerebro, bajos en hígado y riñón y casi nulos en otros tejidos (3).

El órgano de interés para este estudio es el riñón, pues se ha informado que la D-serina provoca nefrotoxicidad en ratas. Este daño tan localizado pudo describirse luego de numerosos estudios, que en su conjunto arrojaron que la D-serina es absorbida exclusivamente en los segmentos S3 (porción recta de los túbulos proximales) (5,6), mediante un transportador (aún no caracterizado por completo) de alta capacidad, pero de poca afinidad y estereoespecificidad, en una proporción similar con la L-serina. Esta última también se reabsorbe en la porción contorneada de los túbulos proximales, mediante un transportador estereoespecífico. Además se encontró que altas concentraciones de L-serina inhiben completamente la reabsorción de D-serina (2,7).

Así pues, la D-serina entra a las células tubulares de la porción recta y entra en contacto con la D-AAO, que se encuentra en los peroxisomas de dichas células. Recientemente se ha encontrado que la D-AAO puede oxidar aminoácidos como D-serina, D-alanina, D-metionina, D-prolina, D-fenilalanina, D-tirosina, D-isoleucina, D-leucina y D-valina, principalmente. Cuando la D-AAO se encuentra altamente purificada, es extraordinariamente selectiva para D-serina.

La D-AAO es capaz de oxidar a la D-Ser por medio de una reacción acoplada a FAD como se muestra en las siguientes reacciones (8):



En la reacción 1, el único paso enzimático, la enzima deshidrogena el aminoácido en el correspondiente iminoácido, acoplado a la reducción del FAD.

Posteriormente el FAD se reoxida en presencia de oxígeno, que a su vez es reducido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2)(reacción 2). Entonces el iminoácido se hidroliza, no enzimáticamente, en el α -cetoácido y amoniaco (reacción 3).

Es precisamente en la transformación enzimática donde está la clave del daño tubular: la oxidación de la D-serina conlleva a la formación de H_2O_2 que puede generar un estado denominado estrés oxidativo, en el que las células sufren alteraciones en macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (2, 9, 10).

La reducción parcial del oxígeno conlleva a la generación de metabolitos potencialmente tóxicos, lo cual está se tratará ampliamente más adelante.

El H_2O_2 se forma en gran medida debido a la cadena de transporte de electrones mitocondrial y puede interactuar con metales de transición con actividad redox o con el propio anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$)(reacción de Haber-Weiss), promoviendo la formación del radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Además, el H_2O_2 atraviesa las membranas y causa daños en sitios cercanos a su formación (11). El OH^{\cdot} , por su parte, se considera el oxidante más potente en los sistemas biológicos, pues reacciona fácilmente con las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, modificándolos y haciéndolos incapaces de llevar a cabo su función normal (11).

Se han encontrado evidencias de que el mecanismo de daño renal causado por D-serina es mediado por estrés oxidativo, pues altas dosis de este compuesto administradas en ratas son oxidadas por la D-AAO en los peroxisomas del túbulo proximal. Debido a que el H_2O_2 originado no puede ser procesado en su totalidad por la catalasa, los radicales de oxígeno se acumulan, disminuyendo las reservas de glutatión reducido y dañando el túbulo (2,10).

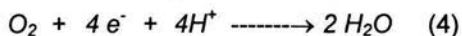
Estudios realizados muestran que las características principales de la nefrotoxicidad por D-serina son: proteinuria, glucosuria y aminoaciduria. Las cuales aparecen al principio de la necrosis tubular (alrededor de 2 horas después de la administración de D-serina) y desaparecen luego de 5 a 7 días, cuando los túbulos han sido completamente reparados por nuevo epitelio (5,12).

También se han llevado a cabo estudios que determinan la secuencia de eventos celulares involucrados en el daño. Se ha encontrado que se da un breve encogimiento inicial de las células, seguido ya sea por hinchamiento y pérdida de citoplasma o por lisis inmediata del contenido citoplásmico y nuclear. Después de la necrosis, sólo queda la membrana de base como barrera entre los fluidos intersticiales y tubulares (13). Las células dañadas presentan rasgos como condensación citoplasmática, fragmentación extensiva del borde en cepillo, dispersión de restos de microvellosidades en los lúmenes tubulares, mitocondrias encogidas, núcleos vacíos, vacuolización y dispersión de ribosomas (13). Posteriormente se empieza a observar la regeneración celular, ya que se encuentran células viables adyacentes a la zona necrótica, que se dividen rápidamente y se distribuyen a lo largo de la base. Éstas presentan un núcleo grande y de forma irregular, nucleolo prominente, gran cantidad de ribosomas y lisosomas y configuraciones mitocondriales anormales (14). Todo lo anterior es signo de síntesis acelerada de proteínas y de rápido recambio de componentes citoplasmáticos. Cuando la reepitelización es completa (en un promedio de 6 días), las células más maduras muestran una morfología normal (13).

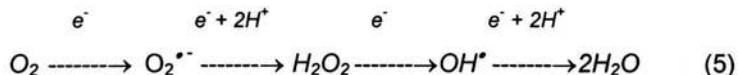
1.2 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva. Dentro de estas especies reactivas las que son de mayor interés para la biología o la clínica son aquellas derivadas del oxígeno y del nitrógeno (15). El oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios; sin embargo, a altas concentraciones puede llegar a ser tóxico debido a la producción de las especies reactivas que se generan. La formación de estas especies reactivas de oxígeno (ERO) se lleva a cabo a partir de la reducción incompleta del oxígeno en los sistemas biológicos, siendo principalmente tres especies las que se forman: el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el H_2O_2 y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}). La mayor parte del oxígeno es reducida completamente a agua

por el complejo citocromo oxidasa (16), a lo que se le conoce como reducción tetravalente y cuya reacción es la siguiente:



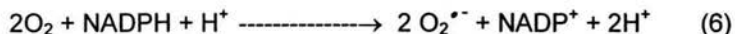
Cuando se da el fenómeno de reducción univalente del oxígeno se forma alguna de las especies reactivas derivadas de él.



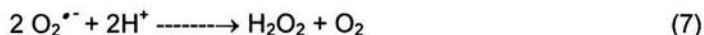
Se calcula que del 1 al 3% del oxígeno respirado es usado para formar anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria. Estas reacciones son inevitables en un organismo dependiente del oxígeno. Además, este radical también es producido por los fagocitos como parte del mecanismo empleado para erradicar organismos extraños como bacterias (15). El H_2O_2 no es un radical libre debido a que no posee electrones desapareados; sin embargo, es un agente que puede difundir y llegar a zonas donde hay pocas defensas antioxidantes. El radical hidroxilo es uno de los agentes más reactivos, ya que interactúa prácticamente con cualquier estructura molecular cercana. Cuando por alguna razón aumenta en exceso la producción de radicales libres en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser ineficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidativo, en la cual existe daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a la muerte celular.

1.2.1 Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

El radical superóxido es la primera especie reactiva de oxígeno formada durante la reducción univalente del oxígeno. Se forma cuando el oxígeno gana un electrón. Bajo condiciones normales es producido en bajas concentraciones por el metabolismo celular a partir de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en reacciones de la enzima xantina oxidasa durante el catabolismo de las bases púricas y durante la descarga respiratoria de los procesos fagocíticos de las células de defensa inmunológica, a través de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa (17).

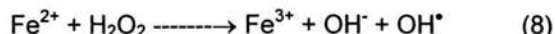


El anión superóxido sufre una dismutación *in vivo* con la ayuda de la enzima superóxido dismutasa (SOD):

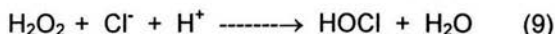


1.2.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ se forma en los organismos durante las reacciones de oxidación de quinonas, oxidación de compuestos que contienen grupos sulfhidrilos y mediante la dismutación del anión superóxido por la acción de la enzima superóxido dismutasa. Sin embargo, la fuente más importante de formación del H₂O₂ en las células es la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Es un oxidante poco reactivo; sin embargo, puede reaccionar con iones como el hierro y el cobre mediante la reacción de Fenton dando lugar a la formación del radical hidroxilo (18).

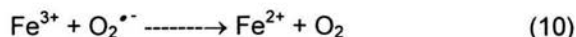


El H₂O₂ puede ser metabolizado por la mieloperoxidasa, una enzima presente en los neutrófilos, en cuya reacción se produce el ácido hipocloroso, HOCl, que es otra especie altamente tóxica, por medio de la siguiente reacción :



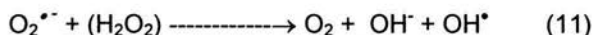
1.2.3 Radical hidroxilo (OH[•])

In vivo, el radical hidroxilo se produce mediante la reacción de Fenton (reacción 8). Por otro lado, el anión superóxido regenera al Fe²⁺ (reacción 10), con lo cual se perpetúa la reacción de Fenton:



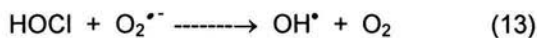
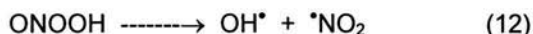
El conjunto de las reacciones descritas; es decir, la dismutación del anión superóxido (O₂^{• -}) que lleva a la producción de H₂O₂, el cual a su vez se descompone en radical hidroxilo (OH[•]) con intervención del Fe²⁺, constituye el ciclo de Haber-Weiss:

Fe²⁺/Fe³⁺



El radical hidroxilo es una molécula muy reactiva y su producción es crítica ya que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en el organismo (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos) (18). Como las células no cuentan con mecanismos antioxidantes para combatirlo directamente, lo que hacen es prevenir su formación mediante la eliminación de sus precursores ($\text{O}_2^{\bullet -}$ y H_2O_2) por sus defensas antioxidantes.

El radical hidroxilo también puede provenir de la descomposición del ácido peroxinitroso (ONOOH, una especie reactiva de nitrógeno, como se verá más adelante) (reacción 12), de la reacción entre el HOCl y el $\text{O}_2^{\bullet -}$ (reacción 13) o de la descomposición del HOCl con intervención de Cu^+ o Fe^{2+} (reacción 14).

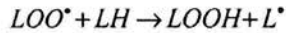
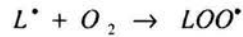


Fe²⁺/Fe³⁺ o Cu⁺/Cu²⁺



1.2.3.1 Formación del 4-hidroxi-2-nonenal

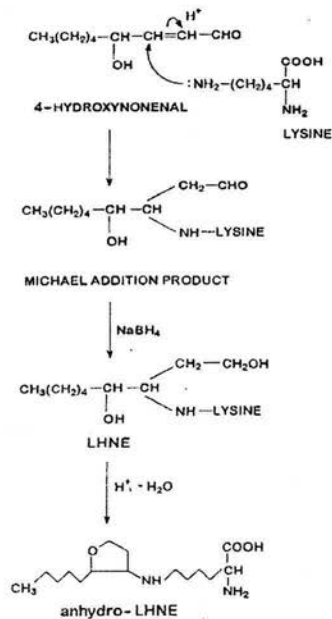
Cualquiera que sea su origen, el radical hidroxilo es la especie responsable de iniciar la peroxidación de lípidos, que es un factor crucial en la propagación del daño celular causado por modificaciones en la permeabilidad de las membranas mitocondriales, lisosomales y plasmáticas (19). El daño oxidativo a lípidos resulta en la formación y propagación de radicales lipídicos, con la generación de una amplia gama de productos de su ruptura, como aldehídos, cetonas, alcoholes y éteres, entre los cuales se encuentra un aldehído α,β -insaturado, el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), producido en el metabolismo de peroxidación del ácido araquidónico o linoléico (19). La formación de los radicales lipídicos se describe en el siguiente esquema (Esquema 2):



Esquema 2. Formación de radicales lipídicos

Donde LH representa a un lípido, L^{\bullet} a un radical lipídico, LOO^{\bullet} es el radical peroxilo y LOOH es un hidroperóxido de lípidos.

El 4-HNE rápidamente interactúa con las proteínas en los residuos de lisina, cisteína e histidina, causando la pérdida de la funcionalidad de éstas (19). A continuación se muestra un esquema (Esquema 3) en el que se observa cómo el 4-HNE interactúa covalentemente con un residuo de lisina (20):



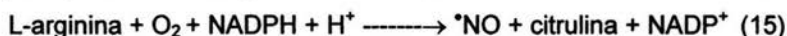
Esquema 3. Formación de un aducto de 4-HNE con un residuo de lisina

En este estudio, el 4-HNE es utilizado como un marcador de estrés oxidativo (lipoperoxidación).

1.3 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

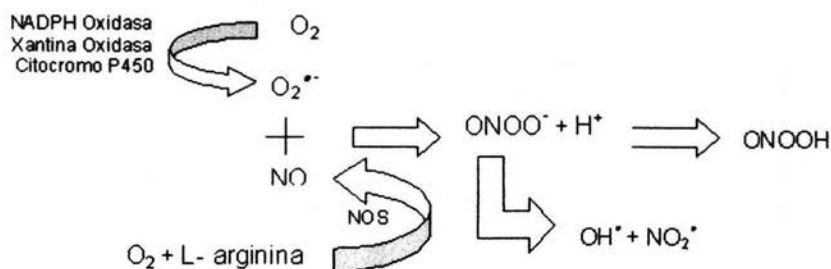
Adicionalmente a las ERO, en los últimos años se ha demostrado la existencia de una nueva clase de oxidantes, las especies reactivas de nitrógeno (ERN) derivadas del óxido nítrico, que a su vez interactúan con algunas ERO para mediar daño a tejidos.

El óxido nítrico (NO) es un compuesto que se genera por la oxidación del grupo guanidino de la L-arginina por la familia de enzimas denominada sintasa de óxido nítrico (NOS) mediante la siguiente reacción:



A pesar de ser un radical libre gaseoso, el NO es relativamente benigno, pues a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble para generar GMP cíclico (cGMP), regula el tono vascular y el transporte de iones en el riñón.

Sin embargo, en un ambiente de estrés oxidativo, el NO puede llevar a la generación de ERN. En la presencia de $\text{O}_2^{\bullet -}$, el NO puede reaccionar con éste muy rápidamente para generar peroxinitrito (ONOO^-), el cual es una especie oxidante y nitrante muy potente que es capaz de atacar muchas moléculas biológicas como proteínas, lípidos y DNA. En su forma aniónica, el peroxinitrito es menos reactivo que en su forma protonada, el ácido peroxinitroso (ONOOH), que muestra actividad semejante a la del radical hidroxilo (11). En el siguiente esquema (Esquema 4) se puede apreciar la formación de las principales ERNs a partir del óxido nítrico:



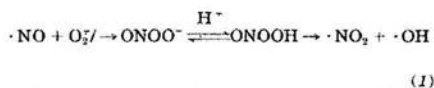
Esquema 4. Especies reactivas de nitrógeno

1.3.1 Formación de 3-nitrotirosina

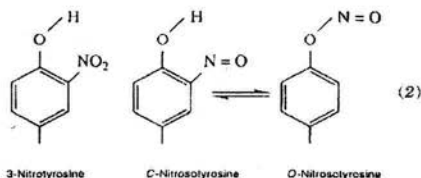
Cuando el ácido peroxinitroso se descompone, da origen a una molécula de radical hidroxilo y una de radical dióxido de nitrógeno, como se describe en esta reacción:



Es este último, $\text{}^{\bullet}\text{NO}_2$, una de las especies responsables de que ocurra la nitración de proteínas, en particular la formación de la 3-nitrotirosina (3-NT), la cual es un marcador de estrés nitrosativo que se usa en este estudio (19) y cuyas reacciones de formación son las siguientes (Esquema 5):



Nitrotyrosine formation (3)



Esquema 5. Formación de nitrotirosina

1.4 Mecanismos antioxidantes de defensa contra las ERO

Los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa contra las ERO que tienden a impedir su formación o a reaccionar con ellas para convertirlas en especies menos reactivas. Estos sistemas de defensa se clasifican en dos tipos: antioxidantes enzimáticos, dentro de los cuales se tienen a las enzimas CAT, SOD, GPx, GSH-Rx principalmente y los antioxidantes no enzimáticos naturales como glutatión, vitamina C, β -carotenos, etc.

1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

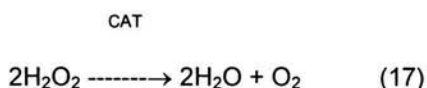
1.4.1.1 Superóxido dismutasa (SOD) (óxido reductasa EC 1.15.1.1)

Es una metaloenzima que lleva a cabo la reacción de dismutación del anión superóxido a oxígeno y H_2O_2 . La actividad de SOD es independiente de pH y tiene una alta afinidad por su sustrato, es resistente al calor y a compuestos

desnaturalizantes como la urea. En los mamíferos, la SOD posee tres isoformas; Mn-SOD, Cu-Zn-SOD y SOD-EC. Las tres se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos y son productos de genes diferentes. Dos de las isoformas poseen en su sitio activo Cu y Zn; una de ellas se localiza en el citosol y la otra es extracelular (SOD-EC). La tercera isoforma tiene en su sitio activo Mn y se localiza en la matriz mitocondrial (17). La SOD no es propiamente una enzima detoxificante, ya que el producto de su actividad es H₂O₂, que también causa daño celular. Sin embargo, este es sólo el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación de las ERO. El siguiente paso depende de enzimas que detoxifican al H₂O₂.

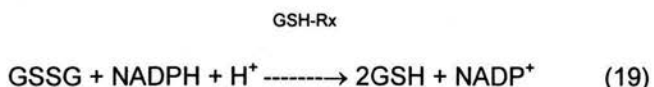
1.4.1.2 Catalasa (CAT) (E.C.1.11.1.6)

La catalasa es una hemoproteína tetramérica con un peso molecular de 240 kDa, con cuatro ferriprotoporfinas por molécula. Su vida media en circulación es relativamente corta: de 6 a 8 minutos. Se localiza principalmente en los peroxisomas (80%) y en la mitocondria. En tejidos de mamíferos, la CAT está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (21). Además de la catalasa, la GPx y la peroxidasa de leucocitos compiten por el H₂O₂ como sustrato. La reacción que lleva a cabo la CAT es la siguiente:



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

Esta enzima cataliza la descomposición de H₂O₂ o de otros peróxidos orgánicos mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) (reacción 18). El GSSG es, a su vez, reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa (GSH-Rx) en presencia de NADPH (reacción 19) formando un ciclo redox impidiendo que se agoten las reservas de GSH (22).

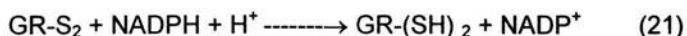


Se conocen diferentes isoformas de ésta enzima, la cual contiene un átomo de selenio en su sitio activo:

- GPx citosólica (cGPx): es una enzima tetramérica de 84 kDa que se cree tiene actividad antioxidante en casos de incremento de H₂O₂ y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra una baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol.
- GPx plasmática (pGPx): es un tetrámero de 100 kDa, sintetizado principalmente en el riñón. Se cree que tiene un papel protector en el riñón durante el daño oxidativo. Actualmente se considera un marcador del daño al túbulo proximal renal, pues su actividad plasmática disminuye durante la necrosis tubular aguda. En la circulación se encuentra como un homotetrámero (23).
- GPx gastrointestinal (giGPx): es un tetrámero de 75 kDa; se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal de los roedores y en hígado y colon en el humano. Se piensa que tiene, al igual que la isoforma citosólica, un efecto protector contra los efectos adversos de los hidroperóxidos.
- GPx de fosfolípidos (PIGPx): es una hidroxidasa de fosfolípidos unida a algunas membranas intracelulares y que tiene una menor afinidad por GSH que las demás.

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

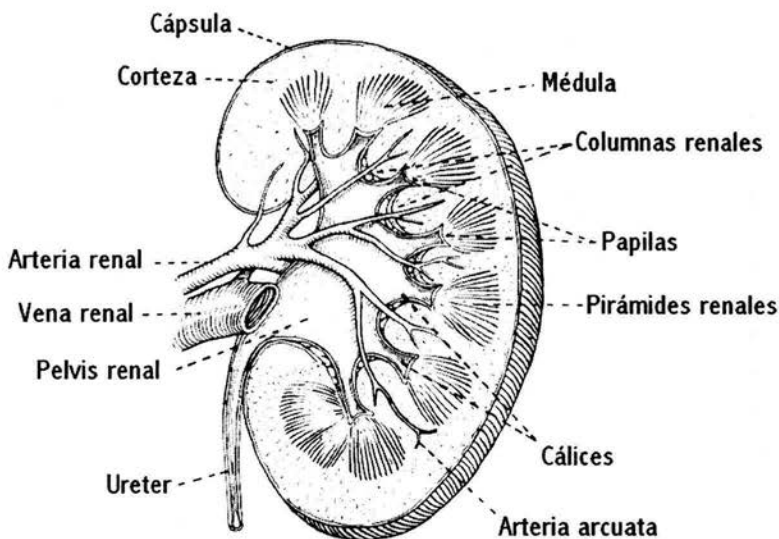
Es una enzima que requiere NADPH y que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) por medio de las siguientes reacciones:



En donde GR-(SH)₂ y GR-S₂ corresponden a las formas reducidas (ditiol) y oxidadas (disulfuro) de la glutatión reductasa, respectivamente (24). Esta enzima es esencial para el ciclo redox que mantiene los niveles adecuados de GSH, el cual sirve como antioxidante al reaccionar con radicales libres y peróxidos orgánicos, participa en el transporte de aminoácidos y es sustrato de glutatión peroxidasa y de glutatión S transferasa durante la detoxificación de peróxidos orgánicos y en el metabolismo de xenobióticos.

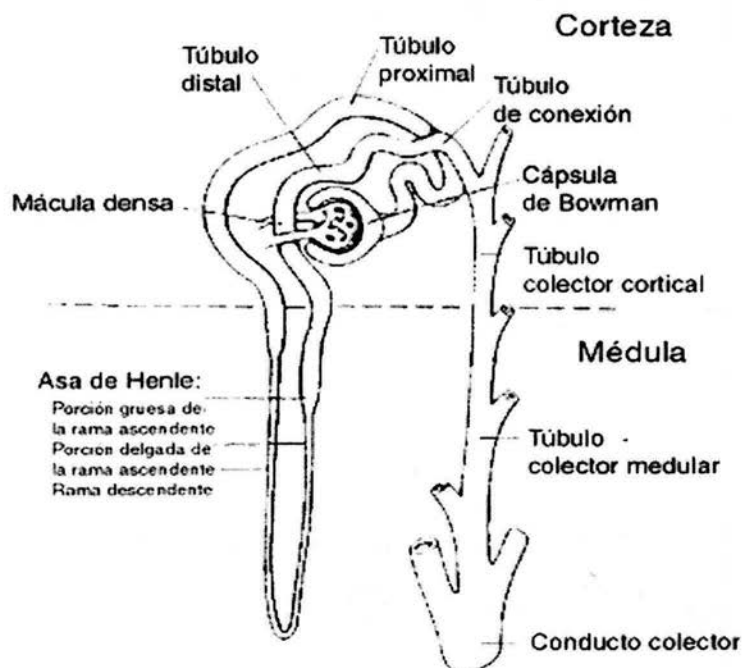
1.5 Generalidades del riñón

El riñón es un órgano que se encuentra en pares y que realiza dos funciones fundamentales: controlar las concentraciones de la mayor parte de los componentes de los líquidos corporales y eliminar gran parte de los productos metabólicos terminales del organismo. En el humano, las dimensiones del riñón son aproximadamente 12x6x3 cm. Los riñones se localizan por debajo del diafragma en la cavidad abdominal posterior. El peso de cada riñón varía de 125-170 g en el hombre y de 115-155 g en la mujer. Están divididos en dos grandes secciones: la corteza y la médula (Esquema 6).



Esquema 6. Estructura interna del riñón

La nefrona es la unidad funcional del riñón, está constituida básicamente por i) un glomérulo a través del cual se filtra parte del plasma sanguíneo y ii) un túbulo largo, en el que el líquido filtrado es convertido en orina en su camino hacia la pelvis renal. El glomérulo se localiza en la corteza renal, es una red de hasta 50 capilares paralelos cubiertos por células epiteliales que están incluidas en la cápsula de Bowman. La presión de la sangre en el glomérulo hace que se filtre el líquido hacia la cápsula de Bowman, de donde pasa al túbulo proximal situado también en la corteza renal. Desde el túbulo proximal, el líquido pasa al asa de Henle, localizada en la médula del riñón, para posteriormente entrar al túbulo distal (encontrado en la corteza renal) y finalmente pasa al túbulo colector que se encarga de reunir el líquido de varias nefronas para luego vaciarse en la pelvis renal (Esquema 7). Cuando el filtrado pasa a través de los túbulos, estos permiten que gran parte del agua y cantidades variables de soluto se reabsorban en los mismos; el agua y solutos que no se reabsorben se transforman en orina (25).



Esquema 7. Estructura de la nefrona

1.5.1 Insuficiencia renal aguda (IRA)

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

- a) Insuficiencia renal aguda secundaria a la disminución de la irrigación sanguínea del riñón, lo que se conoce como insuficiencia renal aguda prerrenal, ya que la alteración se produce antes del riñón.
- b) Insuficiencia renal aguda intrarenal, la cual es debida a alteraciones propias del riñón.
- c) Insuficiencia renal aguda postrenal, secundaria a una obstrucción del sistema colector de la orina en algún lugar entre los cálices y el tracto de la salida de la vejiga (25).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La D-serina es un potente nefrotóxico y se han caracterizado ya los eventos celulares del daño que causa a los segmentos S3. Sin embargo, pocos estudios se han encaminado a vislumbrar el mecanismo del mismo.

Debido a que hay datos preliminares que indican que el estrés oxidativo puede estar involucrado en la nefrotoxicidad por D-serina, en este estudio se pretende evidenciar su existencia mediante un ensayo inmunohistoquímico de 4-HNE y la medición de la actividad de las enzimas que forman parte de los mecanismos de defensas antioxidantes contra las ERO. Así mismo, debido a la gran interacción entre las ERO y las ERN, se llevará a cabo un ensayo inmunohistoquímico para 3-NT, el cual es un indicador de estrés nitrosativo.

3. HIPÓTESIS

Si el estrés oxidativo y/o nitrosativo está involucrado en el mecanismo de inducción de la nefrotoxicidad por D-serina, su presencia quedará evidenciada por las tinciones de 4-HNE y 3-NT y es posible que se observen alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la evolución de la nefrotoxicidad inducida por D-serina mediante la evaluación de marcadores tubulares, glomerulares y de daño estructural e investigar si el estrés oxidativo y/o nitrosativo participa en el mecanismo de daño por medio de las tinciones inmunohistoquímicas y la medición de la actividad de las enzimas antioxidantes.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar el daño renal mediante los marcadores de daño tubular: actividad de NAG en orina, proteinuria y actividad de pIGP_x, y marcadores de daño glomerular: BUN, creatinina en suero y depuración de creatinina.
- Evaluar el daño estructural tubular mediante un análisis histológico utilizando una tinción con hematoxilina y eosina (H&E).
- Evaluar el estrés oxidativo y nitrosativo mediante análisis inmunohistoquímico para determinar lipoperoxidación (4-HNE) y proteínas nitradas (3-NT).
- Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, cGP_x, GSH-Rx y SOD) en la corteza renal de las ratas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

El p-nitrofenil- β -D-glucosamínido, el p-nitrofenol, la albúmina sérica bovina (ASB), la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), la glutatión reductasa, el glutatión reducido (GSH), el glutatión oxidado (GSSG), la xantina oxidasa, la xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT) y los aminoácidos L-serina y D-serina fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El citrato trisódico y la azida de sodio fueron de Merck (Alemania). El carbonato de sodio, el ácido tricloroacético (TCA), el EDTA disódico, las sales de fosfatos para los amortiguadores, el sulfato de cobre, el cloruro de sodio, el cloruro de cobre, el sulfato de amonio y el hidróxido de sodio fueron de J.T. Baker (México, D.F.). El peróxido de hidrógeno al 30% y el tartrato de sodio fueron de Mallinckrodt (México, D.F.). Las determinaciones de urea en sangre y creatinina se realizaron con estuches comerciales de la marca Spinreact, S.A. (España). Los anticuerpos policlonales anti-3-nitro-L-tirosina (3-NT) (obtenidos en conejo) fueron de Upstate (Lake Placid, NY, EUA). Los anticuerpos monoclonales anti-4hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (obtenidos en ratón) fueron de Oxis International Inc. (Portland, OR, EUA). Los anticuerpos anti-Ig de conejo y anti-Ig de ratón marcados con peroxidasa de rábano fueron de Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, Inglaterra).

5.2 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 g de peso, las cuales fueron mantenidas durante todo el tratamiento en jaulas metabólicas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h, con alimentación y agua *ad libitum*.

5.3 Tratamiento de los animales

En el protocolo de 5 días se utilizó un total de 12 ratas, que fueron divididas en dos grupos: control (CT) al que se le administró una sola dosis de 400 mg/kg de L-serina por vía intraperitoneal y el grupo D-serina, al que se administro también por vía intraperitoneal una sola dosis de 400 mg/kg de D-serina para inducir la nefrotoxicidad. En ambos casos se preparó una solución acuosa de 200 mg/mL del correspondiente aminoácido. Estas inyecciones se efectuaron en el día cero,

después de recolectar la orina basal. El sacrificio de los animales se realizó por decapitación el día 5.

El número de animales utilizado para el protocolo de 24 horas también fue de 12 y el tratamiento para inducir la nefrotoxicidad fue el mismo que para el protocolo de 5 días. El sacrificio se llevó a cabo por decapitación el día 1.

5.4 Obtención de las muestras

El peso corporal se monitoreó a diario y se midió el volumen urinario de 24 h de los días 0,1,2,3,4 y 5 (protocolo 5 días) y de los días 0 y 1 (protocolo 24 h). La orina de 24 h se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente; se colocaron 2 alícuotas en tubos eppendorf y se congelaron a -45°C para su uso posterior. Al momento del sacrificio, la sangre de las ratas se recolectó de manera individual en tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm. Después de un tiempo se separó el coágulo, se centrifugaron las muestras a 2,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se separó el suero en 3 alícuotas en tubos eppendorf congelándolas a -45°C hasta su uso.

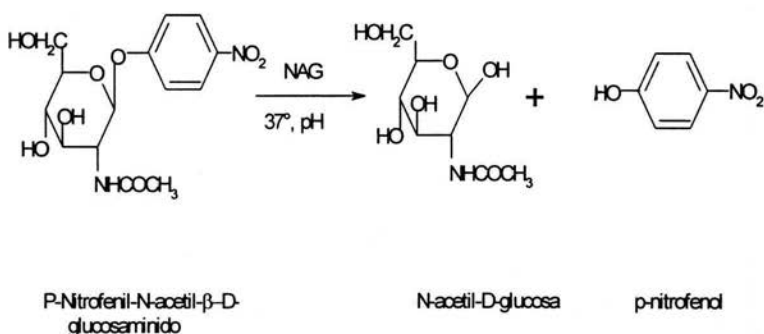
Por otra parte, se extrajeron los dos riñones de cada una de las ratas. Uno de los riñones se cortó transversalmente en tres partes; la parte central se colocó en 500 μL de formol al 10% para la posterior preparación de cortes histológicos, inmunohistoquímica y tinción con H&E. Las partes sobrantes se guardaron a -45°C en tubos eppendorf para posteriormente realizar los homogenados de corteza renal. El otro riñón se cortó transversalmente en dos porciones que cuyo almacenaje fue también a -45°C para realizar homogenados. La corteza se separó de la médula mecánicamente antes de preparar los homogenados de corteza renal en un politrón. Se obtuvieron los sobrenadantes al centrifugar las muestras a 15,300 rpm durante 1 hora a 4°C para las determinaciones de CAT, cGPx, GSH-Rx y SOD.

5.5 Determinaciones

- En las orinas de los días 0,1,2,3,4,5 (protocolo de 5 días) y 0, 1 (protocolo de 24 horas) se determinó la actividad de la enzima NAG, así como la excreción de proteínas totales. La excreción de creatinina se determinó solamente en las orinas del último día de cada protocolo.
- En el suero se determinó la concentración de BUN, de creatinina, y la actividad de la enzima pGPx.
- En la corteza renal se determinó la actividad de las enzimas CAT, cGPx, GSH-Rx y SOD total.
- Se realizaron cortes histológicos del riñón para observar el daño estructural con tinción H&E así como el estrés oxidativo y nitrosativo (inmunotinciones de 4-HNE y 3-NT respectivamente).

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

5.5.1 Actividad de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en orina (Ec 3.2.1.30)



Esquema 8. Actividad de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa; la forma aniónica del p-nitrofenol absorbe a $\lambda=405$ nm

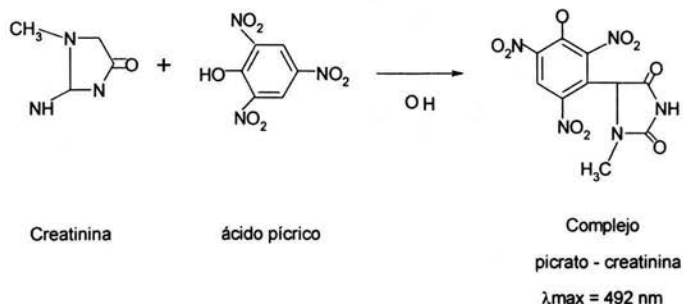
La actividad de la enzima NAG se determinó a través de un ensayo basado en la conversión del p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamínido en N-acetil-D-glucosa y p-nitrofenol, el cual a pH ácido es incoloro y se encuentra protonado y al alcalinizar el medio pasa a su forma aniónica, que absorbe a 405 nm (Esquema 8). Se

utilizaron 50 μL de orina diluidos, se agregaron a 375 μL de amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.4 y posteriormente se adicionaron 125 μL de sustrato (paranitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamínido) (26,27) a una concentración final de 6.8 mM. Para cada muestra se preparó un blanco sin sustrato con 500 μL de amortiguador de citratos y para evaluar la conversión no enzimática del sustrato se preparó un blanco con 550 μL de amortiguador de citratos y un tubo con 425 μL de amortiguador de citratos y 125 μL de sustrato. Todos los tubos se agitaron y se incubaron a 37 °C durante 15 min. La reacción se detuvo con 1.1 mL de Na_2CO_3 0.2 M, pH 10.4 y los tubos se leyeron a 405 nm. Las longitudes de onda máxima de la forma aniónica del p-nitrofenol se interpolaron en una curva de calibración de p-nitrofenol 0.5 mM con rangos de 5 a 175 nM. Los resultados se expresaron como unidades (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un μM de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo.

5.5.2 Excreción de proteínas totales en orina

La concentración de proteínas totales eliminadas en la orina se determinó por medio de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y medición de la turbidez a 420 nm (28). Para ello; después de centrifugar las muestras, éstas se diluyeron 1:5 con solución salina isotónica (SSI), posteriormente las muestras se separaron en dos alícuotas de 1000 μL respectivamente. A una de ellas se agregaron 250 μL de TCA al 12.5% y a la otra 250 μL de SSI para usarla como blanco de la muestra. Los tubos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la determinación de la concentración, los resultados de absorbencias se interpolaron con una curva patrón de ASB entre 0.04 y 0.8 mg/mL. Los resultados se expresaron en mg de proteína/24 h.

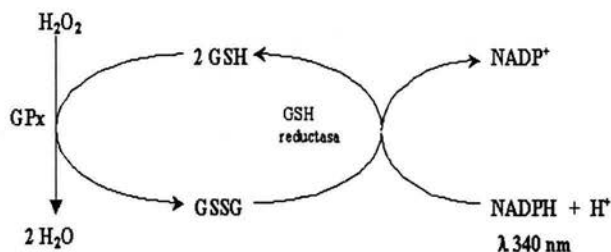
5.5.3 Creatinina en suero y orina



Esquema 9. Reacción de Jaffé

La creatinina presente en suero y orina se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé (Esquema 9), basada en la generación de un color anaranjado al reaccionar la creatinina con el ácido pícrico en solución alcalina. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra. El suero se desproteinizó previamente por precipitación con TCA al 1.25 %. En una celda se adicionaron 50 μL del suero desproteinizado u orina diluida (1:50 con agua) y 500 μL de la mezcla de reacción (ácido pícrico 17.5 mM e hidróxido de sodio al 2% en partes iguales), se leyó en el espectrofotómetro a los 0, 30, 60 y 90 seg. El espectrofotómetro se calibró previamente con un blanco que contenía mezcla de reacción. Posteriormente se leyó el estándar de creatinina de 2 mg/dL a los tiempos antes mencionados. La cantidad de creatinina presente en las muestras se obtuvo comparando la diferencia de lecturas entre los tiempos de 30 y 90 seg con aquella del estándar de creatinina, posteriormente se dividió la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y finalmente se multiplicó el resultado por la concentración del estándar. Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dL. Luego se calculó la depuración de creatinina con la siguiente fórmula: $Cl = (V \cdot O) / (S \cdot 1440)$; en donde Cl es la depuración expresada en mL/min, V es el volumen de orina en 24 h expresado en mL, O y S son las concentraciones de creatinina en orina y suero, respectivamente, en mg/dL y 1440 son los minutos en 24 horas.

5.5.4 Glutación peroxidasa (cGPx y pIGPx) (EC. 1.11.1.19)



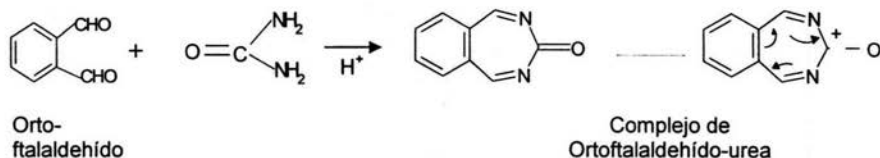
Esquema 10. Actividad de la GPx y regeneración del glutati3n oxidado por medio de la GSH-Rx

La actividad de esta enzima se midi3 en suero y en homogenado de corteza renal de manera indirecta mediante un par de reacciones en las que en presencia de la GPx, glutati3n reducido (GSH) y H_2O_2 se genera glutati3n oxidado (GSSG), el cual a su vez es reducido por la glutati3n reductasa utilizando NADPH como cofactor. La reacci3n se basa en la disminuci3n de la absorbencia del NADPH a 340 nm (29). Las muestras de suero y homogenado de corteza renal se diluyeron (1:8 y 1:10 respectivamente) con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. En un tubo se mezclaron 100 μL de la muestra diluida y 800 μL de la mezcla de reacci3n mantenida en hielo, la cual contenía EDTA dis3dico, azida de sodio, NADPH, glutati3n reductasa, glutati3n reducido y amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. La reacci3n se incub3 a temperatura ambiente durante 5 min y despu3s se adici3n3 a una celda de cuarzo que contenía 100 μL de una soluci3n sustrato, preparada con 2 μL de H_2O_2 al 30% en 10 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. La absorbencia se ley3 a 340 nm durante 3 min a intervalos de 1 min. Se utiliz3 un blanco de actividad inespecífica que se corri3 con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Los resultados se expresaron en U/mL donde 1 U = 1 μmol de NADPH oxidado/min.

5.5.5 Histología

Las porciones de riñón fijadas con formol al 10% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) se trataron con etanol y xilol y posteriormente se embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm y fueron colocados en portaobjetos. A dichos cortes se les eliminó la parafina con xilol y fueron rehidratados con diferentes preparaciones de etanol-agua (100%, 96% y 70%) y teñidos con hematoxilina-eosina (H&E). Finalmente, los cortes ya teñidos se deshidrataron pasando por soluciones de etanol y xilol; se prepararon para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos. Los cortes se analizaron con un microscopio de luz (Leica Qwin Image Analyzer), observando la morfología de los túbulos proximales, buscando indicios de vacuolización y necrosis que indican el daño renal (30).

5.5.6 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)



Esquema 11. Reacción entre la urea y el ortoftalaldehído; el complejo colorido se lee a $\lambda=510$ nm.

La concentración de BUN en suero se determinó con una prueba colorimétrica adaptada de la reacción propuesta por Jung et al. (31) (Esquema 11). Se basa en la reacción de la urea con el ortoftalaldehído a 37° C en medio ácido, donde se forma un producto colorido que absorbe a 510 nm. Se mezclaron 10 μL de la muestra con 400 μL de ortoftalaldehído (4.8 mM) y 400 μL de borato (87 mM). Los tubos se incubaron a 37° C por 15 min; transcurrido ese tiempo se leyeron las absorbencias. En las mismas condiciones se incluyó un blanco y un estándar de urea de 50 mg/dL. La concentración de urea en el suero se obtuvo dividiendo la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y el resultado se multiplicó por la concentración del estándar de urea. Finalmente la cantidad de nitrógeno de la urea se obtuvo dividiendo la concentración entre 2.14

factor que nos indica el número de átomos de nitrógeno en una molécula de urea. Los resultados se expresan en mg/dL.

5.5.7 Catalasa (EC.1.11.1.6)

La actividad de la enzima en homogenados de corteza renal se midió por medio de una reacción cinética en donde disminuye la absorbencia del H_2O_2 debido a su degradación por la catalasa de acuerdo al método de Aebi (32). Se mezclaron 25 μ L del sobrenadante de los homogenados, diluido 1:30 en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 con 725 μ L de H_2O_2 7.7 mM. Esta mezcla se leyó a los 15 y 30 seg a 240 nm. La actividad de catalasa se determinó usando la constante de reacción de primer orden k como la unidad de actividad de la catalasa, la cual se define de acuerdo a la siguiente fórmula:

$k = (1/\Delta t)(2.3 \times \log [A_1]/[A_2])$ donde t = intervalo de tiempo medido, $[A_1]$ y $[A_2]$ son las absorbencias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Finalmente la actividad específica se calculó al dividir el valor de k entre los mg de proteína adicionados al ensayo determinados por el método de Lowry et al. (33). La actividad se expresó como k /mg de proteína.

5.5.8 Glutación reductasa (EC 1.6.4.2)

La actividad de esta enzima se determinó en homogenado de corteza renal por medio de una reacción cinética en la cual esta enzima convierte el glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) en presencia de NADPH como cofactor. La reacción se basa en la disminución de la absorbencia del NADPH a 340 nm (33,34). En un tubo se mezclaron 50 μ L del homogenado (previamente diluido 1:5 en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6), con 950 μ L de la mezcla de reacción la cual contenía EDTA 0.5 mM, glutatión oxidado (GSSG) 1.25 mM y NADPH 0.1 mM. La mezcla se adicionó a una celda de cuarzo y se procedió con la lectura a 340 nm. La absorbencia se leyó durante 3 min a intervalos de 1 min utilizando como blanco amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.6. Los resultados se expresaron en U/mg proteína en donde 1 U = 1 μ mol de NADPH oxidado/min.

5.5.9 Superóxido dismutasa (SOD) total (EC 1.15.1.1)

Se midió en los homogenados de corteza renal por medio de una reacción en la cual se inhibe la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxido generados por el sistema xantina-xantina oxidasa. La reacción se leyó a 560 nm, longitud de onda a la cual absorbe el NBT reducido. Se colocaron 165 μL de sobrenadante del homogenado de riñón (previamente diluido 1:100 con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0) en dos tubos, se incubaron durante 15 minutos con 815 μL de una mezcla de reacción que contenía xantina 0.3 mM, EDTA 0.6 mM, NBT 150 mM, Na_2CO_3 400 mM y albúmina 0.1%. Las reacciones se iniciaron agregando 17 μL de xantina oxidasa (168U/L) a uno de los tubos a intervalos de 10 segundos entre cada muestra, el otro tubo se utilizó como blanco agregando 17 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 en lugar de xantina oxidasa. Las reacciones se detuvieron a intervalos de 10 segundos después de los 15 minutos de incubación con CuCl_2 0.8 mM. Se utilizaron además tubos de 100% de reducción de NBT, los cuales se corrieron con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Finalmente, la cantidad de NBT reducido se leyó a 560 nm y la actividad de SOD total se determinó en base a la concentración de proteína total añadida al ensayo.

5.5.10 Inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE

Para la inmunohistoquímica, secciones de 4 μm se desparafinaron con xilol y se rehidrataron con etanol. La peroxidasa endógena fue inhibida con incubación en H_2O_2 al 4.5% en metanol, por 1.5 horas a temperatura ambiente. La adsorción inespecífica fue minimizada dejando los cortes en albúmina sérica bovina (ASB) al 3% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) durante 30 minutos. Los cortes se incubaron durante toda la noche con una dilución 1:700 del anticuerpo anti-3-NT (19,35) o con una dilución 1:100 del anticuerpo anti-4-HNE (36,37). Luego de repetidos lavados con PBS, los cortes se incubaron con una dilución 1:500 del anticuerpo anti-Ig de conejo (para 3-NT) o anti-Ig de ratón (para 4-HNE) conjugado con peroxidasa, por espacio de 1 hora y finalmente se incubaron con H_2O_2 -diaminobencidina por 1 minuto.

El colorante de contraste fue hematoxilina y los cortes se observaron en un microscopio de luz (Leica Qwin Image Analyzer).

Los cortes de ambos grupos para el protocolo de 24 horas se incubaron bajo las mismas condiciones, con las mismas concentraciones de anticuerpos y en la misma corrida, de modo que la inmunohistoquímica pudiera ser comparable entre los dos grupos manejados (38).

5.6 Análisis estadístico

Los datos se reportaron como la media \pm error estándar ($Y \pm SEM$). Los datos se analizaron con el programa Prism 3.0 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) usando la prueba de ANOVA y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni. Cuando se compararon sólo dos grupos, se utilizó la prueba de t no pareada si las varianzas no eran estadísticamente diferentes. En caso de que lo fueran, se utilizó la prueba U de Mann Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 PROTOCOLO DE 5 DÍAS (EVOLUCIÓN DE LA NEFROTOXICIDAD)

6.1.1 *Peso corporal*

La administración de los aminoácidos L y D-serina no tuvo efecto sobre el peso corporal. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos durante todo el experimento (Fig. 1).



Fig. 1. Efecto de L y D-serina sobre el peso corporal.

6.1.2 *Volumen urinario*

Hay un aumento del volumen urinario en el grupo de D-serina a partir del primer día, el cual es significativo solamente en los días 3 y 4. Para el día 5 el volumen disminuye hasta ser similar al del control (Fig. 2).

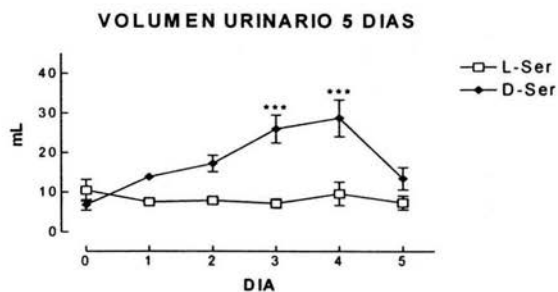


Fig. 2. Efecto de L y D-serina sobre el volumen urinario. *** $p < 0.001$

6.1.3 Parámetros de daño tubular

6.1.3.1 Actividad de NAG en orina

Se observa un incremento muy marcado y significativo en la actividad de NAG en el grupo de D-serina desde el día 1 hasta el día 3. En los días 4 y 5 esta actividad disminuye hasta ser similar a la del grupo control (Fig. 3).

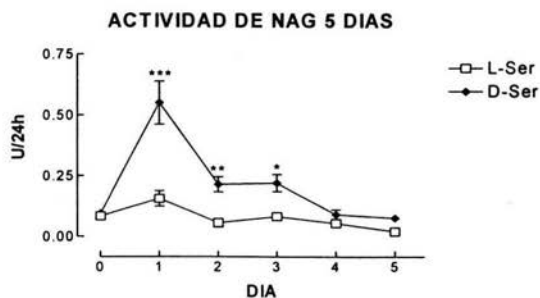


Fig. 3. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de NAG en orina. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

6.1.3.2 Excreción de proteínas totales en orina

Siguiendo un patrón muy parecido al de la NAG, se presentó proteinuria los días 1 y 2 en el grupo de D-serina. A partir del día 3 la excreción de proteínas entre los dos grupos es bastante similar (Fig. 4).

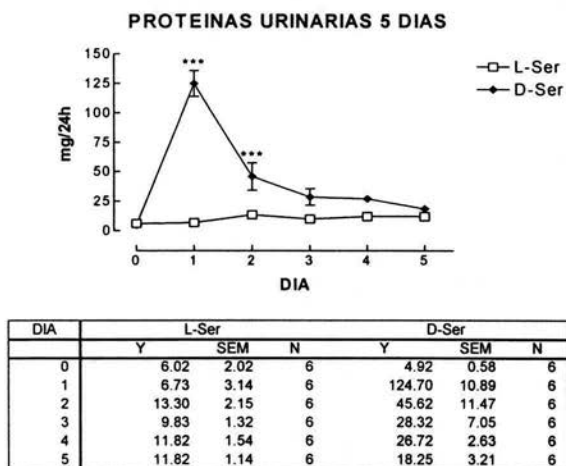


Fig. 4. Efecto de L y D-serina sobre la excreción de las proteínas totales en orina.

*** $p < 0.001$

6.1.3.3 Actividad de GPx en suero

La actividad de esta enzima disminuye ligeramente en el grupo de D-serina, pero esta diferencia no es significativa (Fig. 5).

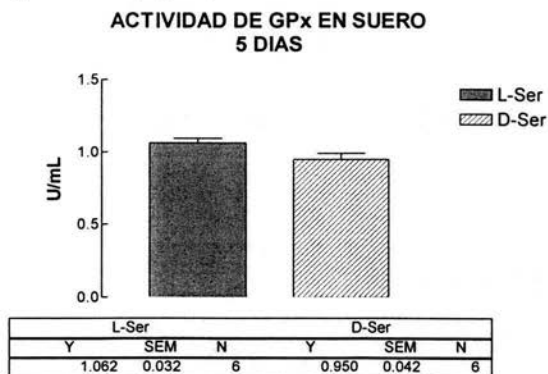


Fig. 5. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de GPx en suero

6.1.4 Parámetros de daño glomerular

6.1.4.1 BUN

Se observa un aumento significativo del 43.9% en la concentración de BUN en las muestras de suero del grupo de D-serina (Fig. 6).

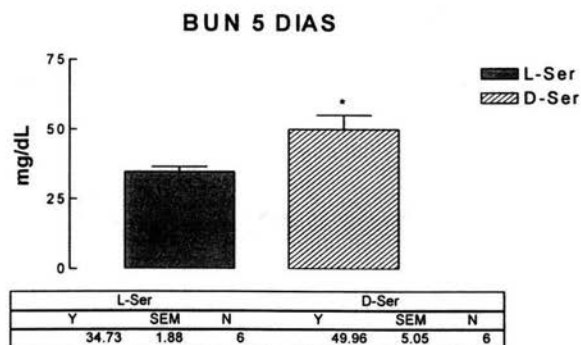


Fig. 6. Efecto de L y D-serina sobre el BUN. * $p < 0.05$

6.1.4.2 Creatinina en suero

Al igual que el BUN, la creatinina en suero aumenta significativamente un 33.4% en el grupo de D-serina (Fig. 7).

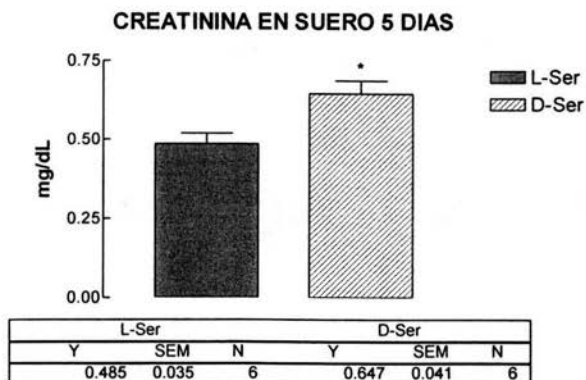


Fig. 7. Efecto de L y D-serina sobre la creatinina en suero. * $p < 0.05$

6.1.4.3 Depuración de creatinina

La depuración de creatinina disminuye no significativamente en el grupo de D-serina (Fig. 8).

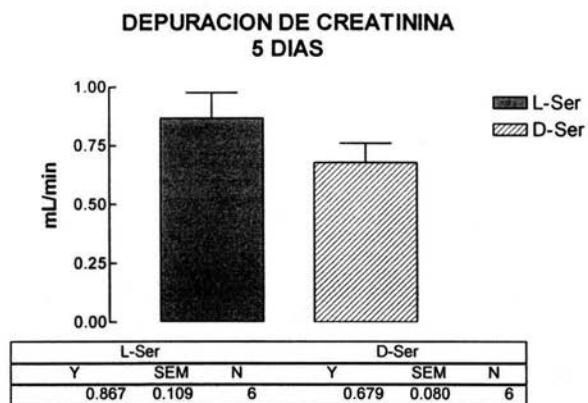


Fig. 8. Efecto de L y D-serina sobre la depuración de creatinina

6.1.5 Actividad de enzimas antioxidantes en corteza renal

6.1.5.1 Actividad de catalasa (CAT)

La administración de D-serina disminuye significativamente, en un 63.8%, la actividad de la enzima catalasa (Fig. 9).



Fig. 9. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de CAT. *** $p < 0.001$

6.1.5.2 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

Se presenta una ligera disminución en la actividad de esta enzima para el grupo de D-serina, la cual no es significativa (Fig. 10).



Fig. 10. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de GPx

6.1.5.3 Actividad de glutatión reductasa (GSH-Rx)

Para el grupo de D-serina, se observa una disminución significativa del 33.8% en la actividad de esta enzima (Fig. 11).

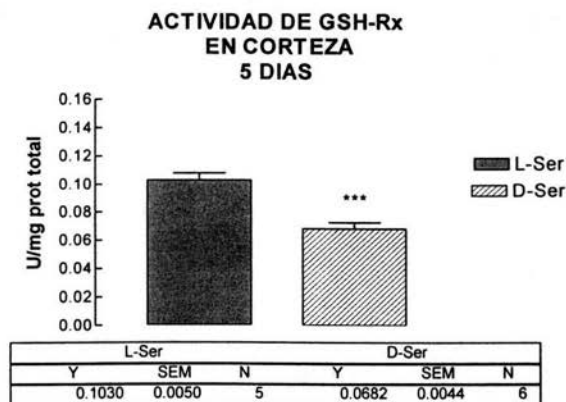


Fig. 11. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de GSH-Rx. *** $p < 0.001$

6.1.5.4 Actividad de superóxido dismutasa (SOD) total

Se observa una disminución ligera (13.2%) pero significativa en la actividad de esta enzima en el grupo de ratas tratadas con D-serina. (Fig. 12).

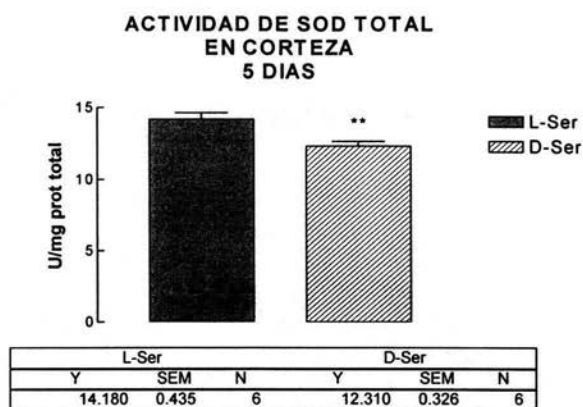


Fig. 12. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de SOD total. ** $p < 0.01$

6.2 PROTOCOLO DE 24 HORAS

Los resultados encontrados en el protocolo de 5 días arrojaron que a las 24 horas (día 1) se observa el mayor daño. Es por ello que se eligió este tiempo para observar diferencias más marcadas entre los grupos, especialmente en los ensayos histológicos e inmunohistoquímicos.

6.2.1 Peso corporal

La administración de los aminoácidos L-serina y D-serina no tuvo efecto sobre el peso corporal (Fig. 13).

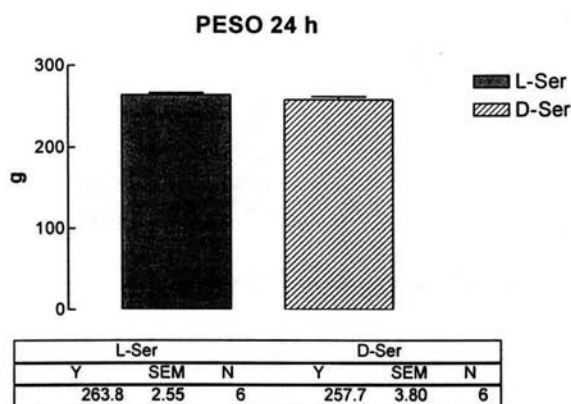


Fig. 13. Efecto de L y D-serina sobre el peso corporal

6.2.2 Volumen urinario

Este parámetro aumenta significativamente en un 144% en el grupo de D-serina (Fig. 14).

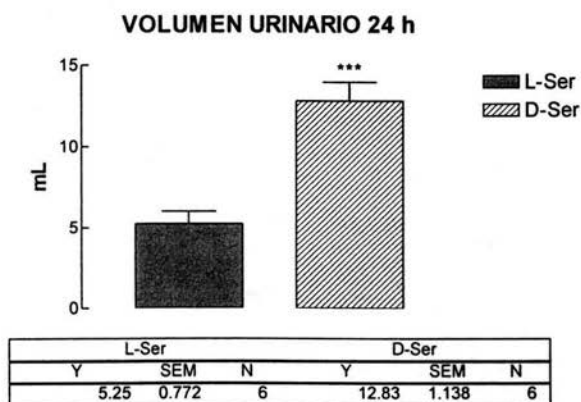


Fig. 14. Efecto de L y D-serina sobre el volumen urinario. *** $p < 0.001$

6.2.3 Parámetros de daño tubular

6.2.3.1 Actividad de NAG en orina

Se observa un aumento significativo del 1052.6% en la actividad de esta enzima en el grupo de D-serina (Fig.15).

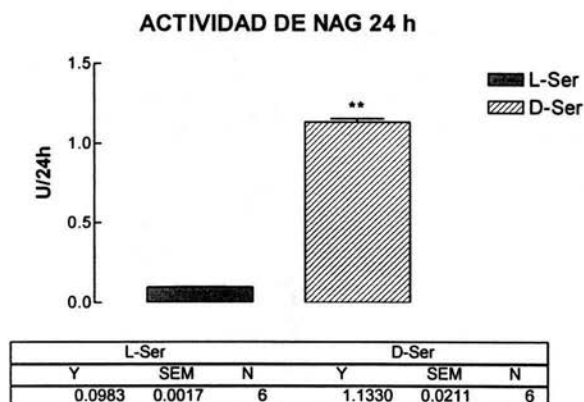


Fig. 15. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de NAG. ** $p < 0.01$

6.2.3.2 Excreción de proteínas totales en orina

De la gráfica se puede observar un aumento significativo del 638.8% de las proteínas excretadas en la orina de los animales tratados con D-serina (Fig. 16).

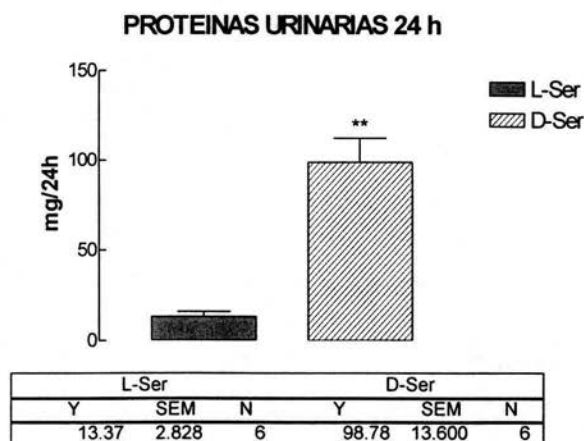


Fig. 16. Efecto de L y D-serina sobre la excreción de proteínas totales en orina.

** $p < 0.01$

6.2.3.3 Actividad de GPx en suero

Se observa una disminución significativa del 27.5% en la actividad de esta enzima en el grupo de D-serina (Fig. 17).

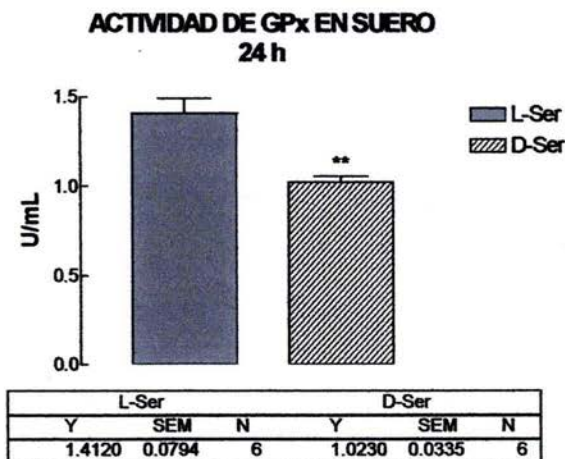


Fig. 17. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de GPx en suero. ** $p < 0.01$

6.2.4 Histología

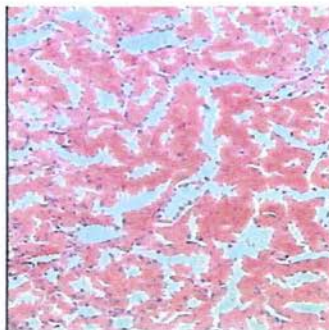


Fig. 18

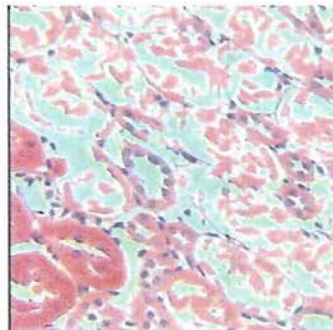


Fig. 19

En las figuras 18 y 19 se muestra la histología de corteza renal de ratas tratadas con L-serina y D-serina, respectivamente. Se puede apreciar que la D-serina induce extensa necrosis y esfacelación del epitelio de revestimiento de la porción recta de los túbulos contorneados proximales. En contraste, los riñones de los animales tratados con L serina no mostraron anomalías histológicas.

6.2.5 Parámetros de daño glomerular

6.2.5.1 BUN

La administración de D-serina provoca un aumento significativo del 197.1% en los niveles de BUN (Fig. 20).

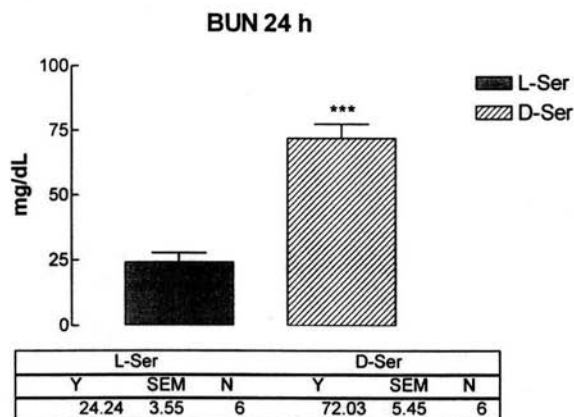


Fig. 20. Efecto de L y D-serina sobre el BUN. *** $p < 0.001$

6.2.5.2 Creatinina en suero

La administración de D-serina provoca un 456.6% de aumento de la creatinina en suero. Dicho aumento es significativo (Fig. 21).

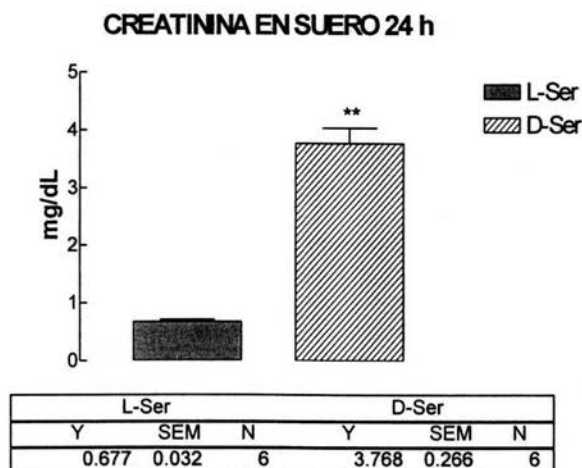


Fig. 21. Efecto de L y D-serina sobre la creatinina en suero. ** $p < 0.01$

6.2.5.3 Depuración de creatinina

Este parámetro disminuye significativamente un 86.5% en el grupo de ratas tratadas con D-serina (Fig. 22).

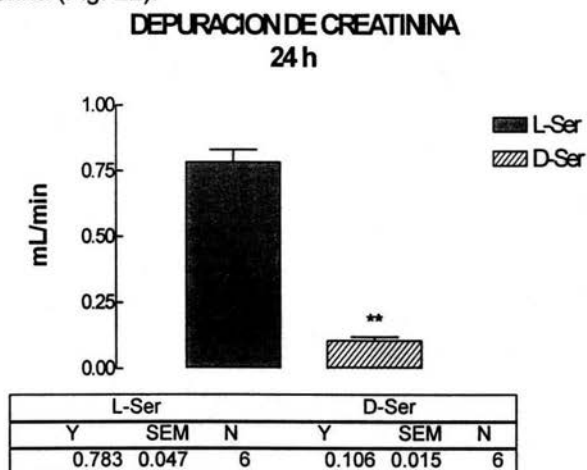


Fig. 22. Efecto de L y D-serina sobre la depuración de creatinina. ** $p < 0.01$

6.2.6. Actividad de enzimas antioxidantes en corteza renal

6.2.6.1 Actividad de catalasa (CAT)

Se puede observar una disminución significativa del 47.5% en la actividad de esta enzima en el grupo de D-serina (Fig. 23).

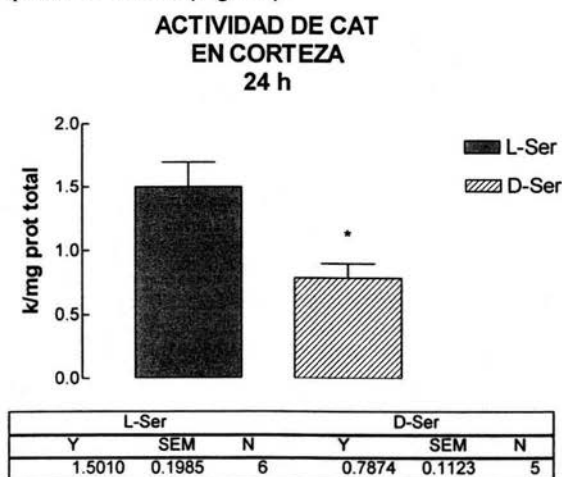


Fig. 23. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de CAT. * $p < 0.05$

6.2.6.2 Actividad de glutatión peroxidasa (Gpx)

Se observa una disminución no significativa en la actividad de esta enzima como consecuencia de la administración de D-serina (Fig. 24).

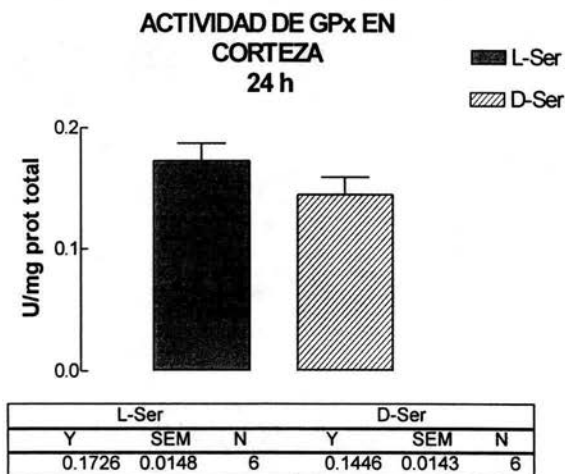


Fig. 24. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de GPx

6.2.6.3 Actividad de glutatión reductasa (GSH-Rx).

Se puede observar una disminución significativa del 25.3% en la actividad de la glutatión reductasa en el grupo de ratas a las que se les administró D-serina (Fig. 25).

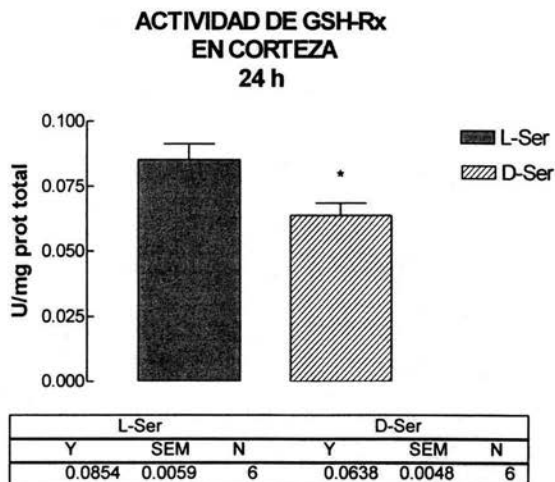


Fig. 25. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de GSH-Rx. * $p < 0.05$

6.2.6.4 Actividad de superóxido dismutasa (SOD) total.

La disminución en la actividad de esta enzima como consecuencia de la administración de D-serina no es significativa (Fig. 26).

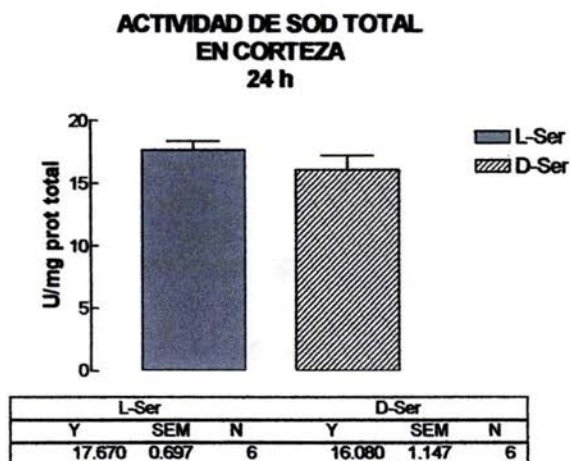


Fig. 26. Efecto de L y D-serina sobre la actividad de SOD total

6.2.7 Inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE

En las figuras 27 y 28 se muestra la inmunotinción para 3-NT en ratas tratadas con L-serina y D-serina, respectivamente y en las figuras 29 y 30 se muestra la inmunotinción para 4-HNE en ratas tratadas con L-serina y D-serina, respectivamente

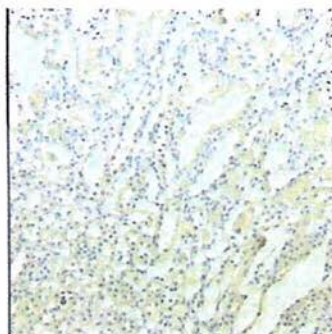


Fig. 27

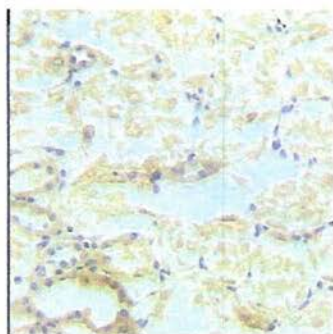


Fig. 28

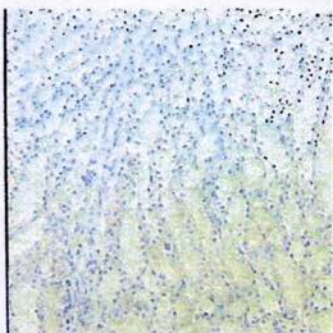


Fig. 29

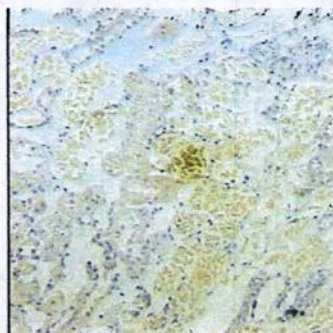


Fig. 30

Las células epiteliales necróticas mostraron intensa inmunotinción para 3-NT (Fig. 28) y 4-HNE (Fig. 30). En contraste, los riñones de los animales tratados con L serina fueron negativos para 3-NT (Fig. 27) y 4-HNE (Fig. 29).

7. DISCUSIÓN

La D-serina es un aminoácido cuya actividad nefrotóxica es bien conocida; sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo para vislumbrar los mecanismos involucrados en ese daño. La nefrotoxicidad inducida por D-serina se hizo evidente con las determinaciones realizadas, pues se observaron alteraciones tanto a nivel tubular como a nivel glomerular.

Se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno, un producto derivado de la oxidación de la D-serina por la D-AAO, es la especie responsable de la nefrotoxicidad. En un estudio realizado por Silbernagl et al. (9,10) se observó que los niveles de glutatión reducido (GSH) disminuyeron después de 4 horas de la administración de D-serina (800 mg/kg) y que dichos niveles se restablecían con la co-administración de GSH. Se manejó, entonces, que el daño por D-serina es mediado por estrés oxidativo, pues el H_2O_2 producido supera la capacidad de la catalasa para metabolizarlo, por lo que se disminuyen las reservas de GSH y se dañan los túbulos proximales (9,10).

Como no se ha evidenciado en ningún otro estudio la posible participación del estrés oxidativo y/o nitrosativo en la nefrotoxicidad por D-serina, el presente estudio está encaminado a hacerlo, así como también a evaluar la actividad de las principales enzimas antioxidantes en corteza renal.

En este estudio se llevaron a cabo dos protocolos distintos, uno de 5 días para poder caracterizar la evolución de la nefrotoxicidad por D-serina, y uno de 24 horas, del cual se obtuvieron los cortes de riñón para los ensayos inmunohistoquímicos de 3-NT y 4-HNE.

Después de la administración con D-serina se encontraron los siguientes resultados.

La concentración de BUN aumentó de manera significativa en ambos protocolos, aunque para el de 5 días los niveles son más cercanos al grupo control que en el de 24 horas. La concentración de creatinina se encuentra elevada de manera significativa en ambos protocolos, pero de nuevo el aumento es más marcado a las 24 horas. La depuración de creatinina, disminuida en ambos protocolos, es significativa sólo para el de 24 horas. Todos estos cambios en los parámetros de daño glomerular sugieren que la D-serina es un compuesto con profundas repercusiones, pues después de 5 días todavía no se alcanza a observar una recuperación funcional del glomérulo, excepto en la depuración. La interrogante aquí es: ¿Por qué si la D-serina daña específicamente a los segmentos S3 de los túbulos proximales, no sólo se aprecia daño estructural en éstos sino también daño funcional en el glomérulo? Hay dos posibles respuestas a esta pregunta: tanto el flujo retrógrado generado por la obstrucción tubular secundaria al daño estructural como la contracción de los vasos y las células mesangiales glomerulares inducidas por las ERO, particularmente el H_2O_2 y el $O_2^{\bullet -}$ (39), son capaces de causar una disminución en la filtración glomerular.

El volumen urinario en el protocolo de 5 días aumentó desde el día uno y ese aumento es significativo en los días 3 y 4 aunque para el quinto día los volúmenes entre ambos grupos son similares. Para el protocolo de 24 horas, hay un aumento marcado y significativo del volumen urinario para el grupo de D-serina. El volumen urinario aumenta debido a que existen zonas de necrosis en los túbulos proximales, o bien porque se ve afectada la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa presente en las células de dichos túbulos, lo que provoca que no se puedan reabsorber ciertos iones como el sodio, que por gradiente osmótico arrastra agua y conlleva al aumento del volumen urinario. Para el quinto día la recuperación tubular hace que el volumen urinario sea similar al del control. La actividad de NAG en orina en el protocolo de 5 días aumenta considerablemente desde el día 1, es significativa los días 1, 2 y 3 pero para el cuarto y quinto días se ve una disminución de la misma hasta ser muy similar al control. En el protocolo de 24 horas, como es de esperarse, hay un aumento muy marcado y significativo en la

actividad de NAG en orina en el grupo de D-serina. La excreción de proteínas totales en orina sigue un patrón casi idéntico al de la NAG, pero en el protocolo de 5 días el aumento en dicha excreción es significativo sólo en los días 1 y 2. El grupo de D-serina muestra proteinuria a las 24 horas (significativa). En ambos protocolos disminuye la actividad de GPx en suero, pero en el de 5 días esa disminución es muy pequeña y no significativa, a diferencia del protocolo de 24 horas, donde la disminución es más notoria y significativa. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, pues para el quinto día se puede apreciar que hay una regeneración tubular, ya que los marcadores de dicho daño regresan a niveles similares a los del control. También se aprecia que el daño por D-serina es severo y casi inmediato, pues en el día 1 dichos parámetros presentaron su mayor alteración, a excepción del volumen urinario.

La histología y los ensayos inmunohistoquímicos se realizaron en cortes del protocolo de 24 horas, que es donde el daño es mayor y permite encontrar diferencias evidentes entre los grupos.

La tinción con H&E para el grupo que recibió D-serina permite apreciar las enormes zonas de necrosis y vacuolización en los túbulos proximales que se localizan en la corteza renal.

En cuanto a la inmunohistoquímica de 4-HNE se observa una reacción positiva (representada por la coloración café) bastante más marcada para el grupo de D-serina. Esto demuestra que la administración de este compuesto causó peroxidación de lípidos, y como esta peroxidación es provocada por acción del radical hidroxilo, una de las ERO, este hallazgo permite sugerir que el estrés oxidativo puede ser uno de los mecanismos de daño renal por D-serina. Los mismos resultados se observan en la inmunotinción de 3-NT para el grupo de D-serina. Como la 3-NT es un marcador de estrés nitrosativo, los resultados sugieren que también puede haber ERN implicadas en el mecanismo de nefrotoxicidad por D-serina, lo cual es de esperarse debido a la estrecha relación y gran interacción que existe entre las especies oxidantes y agentes nitrantes.

En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes en corteza renal, es la CAT la que tiene las disminuciones más marcadas en comparación con las demás

enzimas luego de la administración de D-serina, pues aún en el protocolo de 5 días esa disminución en su actividad es significativa. La GPx disminuye no significativamente su actividad en ambos protocolos. La GSH-Rx, en cambio, tiene una disminución significativa en ambos protocolos. Por último, la SOD total presenta una ligera pero significativa disminución en el protocolo de 5 días y una disminución no significativa en el protocolo de 24 horas.

Las disminuciones en la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas aquí pueden deberse a la acción de las especies oxidantes generadas por la administración de D-serina; no obstante, el estrés oxidativo no es una causa exclusiva de disminución de actividad enzimática.

Este estudio abre las puertas para demostrar que sin lugar a dudas son especies oxidantes y/o nitrosantes las que causan el daño a los segmentos S3, pues para asegurarlo con toda certeza se deben probar compuestos que sean capaces de atrapar alguna de ellas y ver si se puede prevenir el daño causado por la D-serina.

8. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que tanto el estrés oxidativo como el estrés nitrosativo pueden estar asociados al mecanismo de nefrotoxicidad por D-serina.

9. REFERENCIAS

1. Huang Y, Nishikawa T, Satoh K, Iwata T, Fukushima T, Santa T, Homma H, Imai K. Urinary excretion of D-serine in human: comparison of different ages and species. *Biol Pharm Bull* 1998;21:156-62.
2. Silbernagl S, Volker K, Dantzer WH. D-Serine is reabsorbed in rat renal pars recta. *Am J Physiol* 1999;276:F857-63.
3. Snyder SH, Kim PM. D-amino acids as putative neurotransmitters: Focus on D-serine. *Neurochem Res* 2000;25:553-60.
4. D'Aniello A, Vetere A, Petrucelli L. Further study on the specificity of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase and time course for complete oxidation of D-amino acids. *Comp Biochem Physiol B* 1993;105:731-4.
5. Carone FA, Ganote CE. D-serine nephrotoxicity. The nature of proteinuria, glucosuria, and aminoaciduria in acute tubular necrosis. *Arch Pathol* 1975;99:658-62.
6. Carone FA, Nakamura S, Goldman B. Urinary loss of glucose, phosphate, and protein by diffusion into proximal straight tubules injured by D-serine and maleic acid. *Lab Invest* 1985;52:605-10.
7. Shimomura A, Carone FA, Peterson DR. Contraluminal uptake of serine in the proximal nephron. *Biochim Biophys Acta* 1988;939:52-6.
8. Pilone MS. D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1732-47.
9. Silbernagl S, O'Donovan DJ, Völker K. D-Serine nephrotoxicity is mediated by oxidative damage. *Pflüegers Arch* 1997;433:R37.
10. Silbernagl S, O'Donovan DJ, Völker K. Why is D-Ser nephrotoxic? *J Am Soc Nephrol* 1996;7:1846.
11. Ueda N, Mayeux PR, Baliga R, Shah SV. Oxidant mechanisms in acute renal failure. En *Acute Renal Failure*, editado por Molitoris BA, Finn WF. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 2001:60-77.
12. Kaltenbach JP, Ganote CE, Carone FA. Renal tubular necrosis induced by compounds structurally related to D-serine. *Exp Mol Pathol* 1979;2:209-14.

13. Ganote CE, Peterson DR, Carone FA. The nature of D-serine-induced nephrotoxicity. *Am J Pathol* 1974;2:269-82.
14. Peterson DR, Carone FA. Renal regeneration following d-serine induced acute tubular necrosis. *Anat Rec* 1979;193:383-8.
15. Zentella M, Saldaña Y. Papel fisiológico de los radicales libres. *Biol Educ Bioq* 1996;15:152-61.
16. Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins. *Free Radic Biol Med* 1991;11:161-8.
17. Bannister JV, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987;22:111-80.
18. Olinescu R, Smith TL. Free radicals in medicine. New York, Nova Science Publishers, Inc. 2002:26-30.
19. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol* 2001;281: F948-57.
20. Requena RJ, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Torpe SR. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem J* 1997; 322:317-25.
21. Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 1989;79:279-88.
22. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 1994;45:1-9.
23. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem* 1991;109:918-23.
24. Ye B, Gitler C, Gressel J. A high-sensitivity, single-gel, polyacrilamide gel electrophoresis method for the quantitative determination of glutathione reductases. *Anal Biochem* 1997;246:159-65.

25. Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. México McGraw Hill Interamericana 1991:296-301.
26. Jung K, Priem F, Klotsek S, Becker S, Henke W. Methods compared for determining activity of N-acetil- β -D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and spices effect. *Enzyme* 1991;45:215-21.
27. Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thomson AE. A note on the practical aspects of the assay of N-acetil- β -D-glucosaminidase in human urine. *Clin Chem Acta* 1976;69:85-91.
28. Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:245-53.
29. Lawrence RA, Buró RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952-8.
30. González Orozco AE. El dialil disulfuro atenúa el daño renal y el estrés oxidativo inducidos por gentamicina en ratas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM 2003.
31. Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU, New colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 1975;21:1136-40.
32. Aebi HE. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
33. Lowry OA, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
34. Calberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975;250:5475-80.
35. Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1390-8.
36. Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Stadtman ER. Formation of 4-hydroxi-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91: 2616-20.

37. Zainal TA, Weindruch R, Szewda LI, Oberley TD. Localization of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in kidney following iron overload. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1181-93.
38. Pedraza-Chaverí J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernández-Pando R. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clin Pharmacol* 2004;4:5.
39. Duque I, Garcia-Escribano C, Rodríguez-Puyol M, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodríguez-Puyol D. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 1992;263:F466-73.