



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LA
S-ALILCISTEÍNA (SAC) Y SU EFECTO EN
EL DAÑO RENAL INDUCIDO POR
ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

T E S I S

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

P R E S E N T A :

SABINA SEGOVIANO MURILLO

TUTOR: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LA
S-ALILCISTEÍNA (SAC) Y SU EFECTO EN
EL DAÑO RENAL INDUCIDO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri 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:

Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología, UNAM
Dra. Rachel Mata Essayag	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica del M en C. Omar Medina Campos.

Se reconoce la asesoría y colaboración del Dr. Javier Sánchez de la Escuela Médico Militar.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (40009-M). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Rachel Mata Essayag	Facultad de Química, UNAM.
VOCAL	Dr. Armando Tovar Palacio	Fisiología de la Nutrición, INNSZ.
SECRETARIO	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
SUPLENTE	Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM.
SUPLENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre conmigo y no dejarme sola nunca.

A mi mamá por su amor y siempre procurar lo mejor para mí y mis hermanas.

A mi papá por seguir aquí, por aconsejarme y ayudarme a no desesperarme.

A mis hermanitas Sely, por nunca abandonarme y ayudarme a ver las cosas con más tranquilidad, por escucharme y, Sici por sus consejos, recomendaciones y bromas.

A mi abuelito y mi abuelita Lore por demostrarme su cariño y orar por mí.

A mi abuelita Inés y a mi abuelito Abraham, por su confianza en mí.

A mis tios y primos por compartir su alegría.

A Lucy, Moni, y personas que trabajan en el bioterio del Edificio E de química, que me apoyaron y tuvieron paciencia para iniciar este proyecto

A Omar por su tiempo, por compartir su experiencia, por insistir en analizar y entender antes que hacer.

Al Dr, Pedraza-Chaverrí por darme la oportunidad y sus consejos.

A Irasema y Marisol por ayudarme, acompañarme, apoyarme, aconsejarme y “entrenarme” para las situaciones difíciles.

A Noemí por animarme a seguir adelante con confianza en mí.

A Paola por ser también mi maestra y amiga, compañera de aventuras en el laboratorio y en el bioterio.

A Octavio por hacerme ver la vida un poquito diferente a lo habitual, desde otra perspectiva.

A Susana y Silvia por ayudarme a no estresarme tanto.

A Meche y Adriana por estar ahí cuando necesité ayuda.

A la Dra Ibarra, por su confianza y atenciones.

A todos los amigos que conocí durante la maestría, por darme su apoyo cuando más lo necesité.

A todos por hacer grata mi estancia en el laboratorio.

ABREVIATURAS

~	aproximadamente
3-NT	3-nitrotirosina
4-HNE	4- hidroxinonenal
BUN	nitrógeno de urea en suero
CAT	catalasa
CI ₅₀	concentración inhibitoria media
CQ	control quirúrgico
DHR 123	dihidrorodamina 123
DMSO	dimetil sulfóxido
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPTA	ácido dietilen triamino pentaacético
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EN	estrés nitrosativo
eNOS	sintasa de óxido nítrico endotelial
EO	estrés oxidativo
ERN	especies reactivas de nitrógeno
ERO	especies reactivas de oxígeno
GPX	glutación peroxidasa
GSH	glutación reducido
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
I40R6	40 minutos de isquemia y 6 horas de reperfusión
iNOS	sintasa de óxido nítrico inducible
ip	intraperitoneal
IR	isquemia/reperfusión
IR+SAC	grupo con isquemia/reperfusión tratado con SAC
IRA	insuficiencia renal aguda
L-NIL	L-N(6)-(1-iminoetil)-lisina
NBT	nitroazul de tetrazolium
NDGA	ácido nordihidroguayarático
NO [•]	óxido nítrico (monóxido de nitrógeno)
NOS	sintasa de óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	anión superóxido
OH [•]	radical hidroxilo
ONOO ⁻	peroxinitrito (oxoperoxinitrato)
PAS	ácido periódico de Schiff
PBN	α-phenil-N-tert-butyl-Nitrona
SAC	S-alilcisteína
SOD	superóxido dismutasa
TBARS	sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
THB	tetrahidrobiopterina

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. ANTECEDENTES	3
1. TOXICIDAD DEL OXÍGENO Y NITRÓGENO	3
1.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN)	3
a. Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	4
b. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	4
c. Radical hidroxilo (OH^{\cdot})	5
d. Óxido Nítrico (NO^{\cdot})	5
e. Peroxinitrito ($ONOO^-$)	5
1.2 Generación de ERO y ERN en los sistemas biológicos y sistemas antioxidantes celulares	5
1.2.1 Fuentes de ERO durante el metabolismo celular normal	5
1.2.2 Sistemas antioxidantes enzimáticos	6
a. Superóxido dismutasa (SOD)	6
b. Catalasa (CAT)	7
c. Glutación peroxidasa (GPX)	7
d. Glutación reductasa (GSH-Rx o NAD[P]H:GSSG oxidoreductasa)	8
1.2.3 Sistemas antioxidantes no enzimáticos	8
a. Antioxidantes hidrosolubles	8
b. Antioxidantes liposolubles	8
1.3 Estrés oxidativo y nitrosativo	9
2. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA) POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN	10
2.1 Riñón: anatomía y fisiología	10
2.2 Insuficiencia renal aguda	12
2.3 Isquemia / reperfusión (IR)	13
2.3.1 Importancia clínica	13
2.3.2 Concepto	13

2.4 Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño en la isquemia y reperfusión renal	14
a. Xantina oxidasa	14
b. Mitocondrias	15
c. NADPH oxidasa	15
d. Sintasa de óxido nítrico	15
3. AJO Y S- ALILCISTEINA (SAC)	17
3.1 Ajo	17
3.2 SAC y su farmacocinética	18
3.3 SAC como antioxidante	20
II. JUSTIFICACIÓN	23
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. MATERIALES	24
1.1 Reactivos	24
1.2 Equipo	25
1.3 Animales	25
2. MÉTODOS	25
A. Estudio <i>in vitro</i>. Procedimiento	25
a. Preparación de los extractos de ajo	26
b. Síntesis de peroxinitrito	26
c. Preparación de soluciones/reactivos para el ensayo	26
d. Fundamento del ensayo	27

e. Ensayo	27
B. Estudio <i>in vivo</i>	28
1. Diseño experimental.	28
1.1. Grupos	28
1.2. Modelo de isquemia/reperfusión (I40R6)	28
1.3. Esquema/dosis de SAC	28
2. Obtención de muestras.	29
3. Tratamiento de muestras.	29
3.1. Suero	29
3.2. Homogenados renales para determinación de actividad enzimática	29
3.3. Homogenados renales para determinación de proteínas oxidadas	29
3.4. Cortes histológicos	29
4. Determinaciones	30
4.1 Evaluación de la insuficiencia renal.	30
4.1.1 Marcadores bioquímicos	30
4.1.1.1 Nitrógeno de Urea en sangre (BUN).	30
4.1.1.2 Creatinina sérica.	31
4.1.2 Evaluación del daño estructural (tinción de PAS).	31
4.2 Evaluación del estrés oxidativo.	31
4.2.1 Contenido de carbonilo en proteínas (proteínas oxidadas).	31
4.2.2 Inmunohistoquímica de 4-HNE	32
4.2.3 Inmunohistoquímica de nitrotirosina (3-NT).	34
4.3 Evaluación del sistema antioxidante.	35
4.3.1 Actividad de catalasa (CAT).	35
4.3.2 Actividad de la superóxido dismutasa total (SOD).	35
4.3.3 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPX).	36
5. Análisis estadístico	37

VI. RESULTADOS	
A. Estudio <i>in vitro</i>	38
a. Capacidad atrapadora de peroxinitrito (IC ₅₀).	38
b. Capacidad atrapadora de la SAC comparada con extractos de ajo y compuestos de referencia	38
B. Estudio <i>in vivo</i>	40
1. Evaluación de la insuficiencia renal.	40
1.1 Marcadores bioquímicos	41
1.2 Análisis histológico	42
2. Marcadores de estrés oxidativo en tejido renal.	43
2.1 Contenido de grupos carbonilo en las proteínas (proteínas oxidadas)	43
2.2 Contenido de 4-hidroxinonenal (4-HNE)	44
2.3 Contenido de nitrotirosina (3-NT)	44
3. Evaluación del sistema antioxidante (actividad de las enzimas antioxidantes) en tejido renal.	47
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. RESUMEN DE RESULTADOS	52
IX. CONCLUSIONES	52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMEN

ANTECEDENTES: Tanto el estrés oxidativo como el estrés nitrosativo se han relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas la insuficiencia renal aguda (IRA) causada por isquemia/reperfusión (IR) la cual se caracteriza principalmente por necrosis tubular aguda y, en consecuencia, retención de productos nitrogenados en sangre. Entre los eventos que conducen a ella se encuentran el choque hipovolémico, la cirugía de aneurisma aórtico abdominal y durante los trasplantes renales. Dado el papel del estrés oxidativo en diversos modelos de enfermedad, los compuestos antioxidantes se han utilizado como estrategia para determinar si pueden tener acción protectora frente al daño. Uno de ellos es la S-alilcisteína (SAC), la cual es un compuesto organosulfurado hidrosoluble derivado del ajo con capacidad antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* ya que entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) que atrapa, se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); las ERO mencionadas, junto con el peroxinitrito ($ONOO^-$), están involucradas en el daño renal por IR. Además, la SAC posee propiedades farmacocinéticas que la hacen favorable para su uso como medicamento ya que se absorbe fácil y rápidamente en el tracto gastrointestinal y se distribuye principalmente en plasma, hígado y riñón. Su toxicidad es muy baja, ya que en ratas su dosis letal 50 (DL_{50}) es mayor a 9 g/Kg vía oral y mayor a 3 g/Kg por vía intraperitoneal. Su vida media y de excreción son largas, así como su biodisponibilidad alta. En ratas es excretada principalmente en la orina como N-acetil-SAC. Las concentraciones de SAC en los diferentes órganos son variables, pero a los 15 min el riñón es el que tiene la mayor cantidad (con dosis única por vía oral de 25 mg/Kg) y se mantienen niveles cercanos por aproximadamente 1 hora.

JUSTIFICACIÓN: Por una parte, aunque ya se han descrito las propiedades antioxidantes de la SAC como su capacidad para atrapar algunas ERO, aún no se ha caracterizado su capacidad atrapadora de peroxinitrito en un sistema *in vitro* y, por otra, es importante estudiar este modelo de enfermedad porque el daño por IR en el riñón se presenta de forma frecuente en la práctica clínica, ya que la lesión isquémica está presente en alrededor del 50% de los pacientes con insuficiencia renal aguda (IRA). Dado que existe amplia evidencia donde se demuestra el papel de las ERO como importantes mediadores en el daño tisular por IR renal, se justifica utilizar como estrategia de protección a la SAC por ser un compuesto antioxidante económico, estable, de toxicidad muy baja, con excelentes propiedades farmacocinéticas que pudiera ser utilizado en la práctica clínica para prevenir el daño renal inducido por IR en las distintas condiciones en que está involucrada.

HIPÓTESIS: Si ya se ha demostrado que la SAC protege del daño celular asociado a ONOO^- , se espera que sea capaz de atraparlo directamente en un sistema *in vitro*. Además, ya que la SAC tiene capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, se espera que dicho compuesto tenga un efecto protector sobre la función renal y sobre marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en el daño renal inducido por IR.

OBJETIVO: Evaluar la capacidad de la SAC para atrapar peroxinitrito *in vitro* y, si es capaz de atenuar el daño renal inducido por IR en ratas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL: En el estudio *in vitro* se realizó el ensayo con dihidrorodamina¹²³ para evaluar la capacidad atrapadora de peroxinitrito de la SAC. En el estudio *in vivo* el modelo de IR consistió en isquemia unilateral con nefrectomía derecha, 40 min de isquemia y 6 horas de reperfusión (I40R6), donde el tratamiento con SAC consistió en 4 dosis de 100 mg/Kg/vía intraperitoneal durante la cirugía (15 min antes de la nefrectomía, 15 min antes de la isquemia, inmediatamente antes de la reperfusión y 2 horas después de la reperfusión). Se extrajo el riñón isquémico para hacer análisis histológico con ácido periódico de Schiff (PAS), así como la evaluación del estrés oxidativo a través de determinaciones enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), cuantificación de proteínas oxidadas e inmunohistoquímica para 4- hidroxinonenal (4-HNE) y 3-nitrotirosina (3-NT). Para evaluar la función renal se determinaron nitrógeno de urea en suero (BUN) y creatinina sérica.

RESULTADOS: La SAC y los extractos de ajo atrapan ONOO^- de manera dependiente de la concentración; la SAC, con una $\text{CI}_{50} = 0.803 \pm 0.040 \text{ mM} = 134 \pm 9 \text{ } \mu\text{g/mL}$, fue más efectiva que el extracto acuoso de ajo crudo y que el polvo de ajo, pero menos efectiva que los compuestos de referencia usados (penicilamina y NDGA). Además presentó protección parcial frente al daño renal con una dosis de 400 mg/Kg dividida en 4 administraciones durante el evento quirúrgico, lo que se evidenció en la disminución de BUN, creatinina y menor daño estructural. También disminuyó el estrés oxidativo (lipoperoxidación) evaluado como contenido de aductos de 4-HNE por inmunohistoquímica. Pero no previno la disminución de las actividades enzimáticas ni la nitración de proteínas.

CONCLUSIONES: La SAC atrapa directamente al ONOO^- *in vitro*. Sin embargo, los datos de nuestro trabajo señalan que, el papel protector parcial que se observó sobre la función renal y el estrés oxidativo pudiera estar más relacionado con su capacidad atrapadora de otras ERO reportadas previamente más que por su capacidad atrapadora de peroxinitrito.

I. ANTECEDENTES

1. TOXICIDAD DEL OXÍGENO Y NITRÓGENO

1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (ERN)

El oxígeno atmosférico (21% de la composición de la atmósfera) es indispensable para la vida de los organismos aerobios, ya que es necesario para la producción del 80% de la energía que requieren, pues entre el 85 y 90% del oxígeno que se consume, se utiliza en las mitocondrias para la producción de ATP. En su estado basal y a temperatura ambiente reacciona poco a pesar de que es un birradical (que tiene dos electrones libres o desapareados). Esto se debe a que sus electrones desapareados tienen el mismo spin (giro), por lo que sólo pueden reaccionar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto (revisado en Hansberg-Torres, 2002). Sin embargo, también se ha demostrado un papel tóxico del oxígeno, el cual se explica por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son aquellas especies químicas derivadas del oxígeno que son más reactivas que éste en su forma diatómica (O_2) e incluyen tanto a radicales como a productos no radicales. Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir de forma independiente que contiene uno o más electrones desapareados, y generalmente es muy reactivo, por lo cual es capaz de dañar fácilmente a los sistemas biológicos. Por otra parte, los no radicales incluyen a los productos que no contienen electrones desapareados pero que también son muy reactivos o bien, son estables pero que son capaces de generar radicales u otras especies reactivas (revisado en Hansberg-Torres, 2002; Halliwell y Gutteridge 1999; Eberhardt, 2000). Aunque las especies reactivas pueden derivarse no sólo del oxígeno sino también de muchos otros elementos o moléculas químicas, desde el punto de vista biológico las más importantes son como ya se mencionó aquellas derivadas del oxígeno pero también lo son las especies reactivas de nitrógeno (ERN), las cuales son aquellas especies oxidantes derivadas del óxido nítrico (NO^\bullet) e igualmente pueden ser radicales o no radicales. Al igual que las ERO, también se producen de forma constitutiva dentro de la célula como parte de su metabolismo (revisado en Turrens, 2003).

Dentro de la célula, las ERO pueden ser producto de la reducción parcial o univalente del oxígeno (Fig. 1), formando así, el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\bullet) o, también pueden formarse por la reacción del oxígeno con otros elementos, por ejemplo el

ácido hipocloroso (HOCl) que se forma por la reacción del H₂O₂ con cloro (revisado en Ueda y col., 2001; Hansberg-Torres, 2002; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

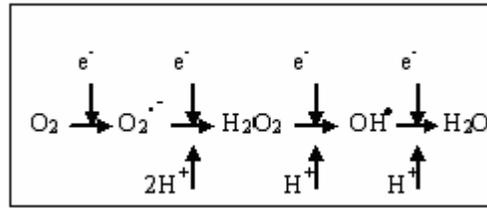


Fig. 1. Reducción univalente del oxígeno

Entre las principales ERO y ERN de las cuales se han descrito sus efectos tóxicos a nivel celular y molecular se encuentran:

- a. Anión superóxido (O₂^{•-}): se forma por adición de un electrón al oxígeno molecular. A pesar de ser una especie poco reactiva, ya que por sí mismo no daña directamente a las proteínas, lípidos o DNA, es tóxica porque puede atacar los sitios activos de enzimas con centros Fe-S, causando su inactivación y liberando Fe²⁺ o bien participar reduciendo el Fe³⁺ a Fe²⁺ el cual se requiere para catalizar la formación de otra ERO muy oxidante, el radical hidroxilo (OH[•]) en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Fig. 2) (Flint y col., 1993; Liang y Patel, 2004; revisado en Benov, 2001; Turrens, 2003; Gutteridge, 1994).
- b. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂): Tiene la capacidad de difundir y atravesar las membranas hacia el espacio extracelular y, además, puede dar lugar a la formación de radical hidroxilo al reaccionar con el O₂^{•-} en la reacción de Haber-Weiss con la participación de metales de transición como el Fe²⁺ o Cu²⁺ (revisado en Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

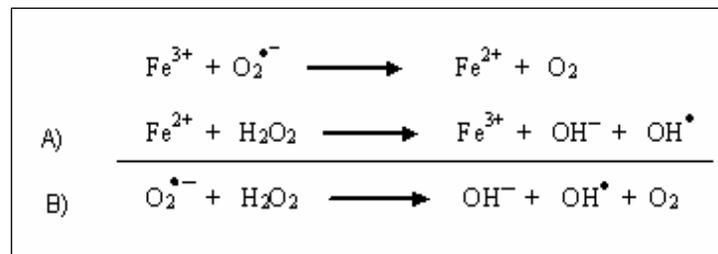


Fig. 2. A) Reacción de Fenton, B) Reacción de Haber-Weiss (revisado en Eberhardt, 2000).

- c. Radical hidroxilo (OH^\bullet): altamente reactivo, es la principal ERO que ocasiona daño celular ya que reacciona muy rápidamente con casi todas las biomoléculas, formando además radicales libres de las moléculas con las que reaccionó (revisado en Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

- d. Óxido nítrico (monóxido de nitrógeno: NO^\bullet): Es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS). Aunque es un radical libre muy poco reactivo, es precursor de otras ERN entre las que se encuentran el peroxinitrito, el ácido peroxinitroso, el dióxido de nitrógeno y el trióxido de dinitrógeno, las cuales sí son muy reactivas. Además es capaz de formar complejos con los iones metálicos del grupo hemo y producir aductos nitrosil-hemo con algunas hemoproteínas, lo que puede impedir las funciones biológicas tanto del NO^\bullet como de las hemoproteínas (revisado en Cárdenas-Rodríguez y col, 2006; Cassina y Radi, 1996).

- e. Peroxinitrito (oxoperoxinitrato: ONOO^-): es producto de la reacción entre dos radicales, el NO^\bullet y el $\text{O}_2^{\bullet-}$. No es un radical, sin embargo es altamente reactivo ya que tiene la capacidad de modificar a las moléculas biológicas ya sea por oxidación o por nitración (revisado en Cárdenas-Rodríguez y col, 2006; Turrens, 2003; Cassina y Radi, 1996).

1.2 GENERACIÓN DE ERO Y ERN EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES.

1.2.1 Fuentes de ERO durante el metabolismo celular normal

En los organismos aerobios, las ERO y las ERN se generan de forma continua como parte de su metabolismo y algunas de ellas juegan un papel importante dentro de la fisiología celular, por ejemplo, como mediadores de señalización (NO^\bullet y H_2O_2), como mecanismo de acción frente a las infecciones en el sistema inmunológico (por ejemplo $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl y $^1\text{O}_2$) o, en el control de la presión sanguínea (NO^\bullet), entre otros. Entre las principales fuentes de ERO y ERN en los sistemas biológicos se encuentran las mostradas en la tabla 1 (revisado en Cárdenas-Rodríguez y col, 2006; Chirino y col, 2006; Ueda y col., 2001; Turrens, 2003; Gutteridge, 1994).

Tabla 1. Principales fuentes de ERO durante el metabolismo celular normal.

FUENTE DE ERO	ERO
Cadena de transporte de electrones mitocondrial	$O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2
Sistema enzimático xantina oxidasa durante el catabolismo de las purinas	$O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2
Membranas microsomales y nucleares	$O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2
Complejo enzimático NADPH oxidasa	$O_2^{\bullet-}$
Peroxisomas	H_2O_2
Superóxido dismutasa (SOD)	H_2O_2
Reacciones de Fenton y Haber-Weiss	OH^{\bullet}
Mieloperoxidasa (MPO): neutrófilos	$HOCl$
Fagocitosis (fagocitos activados)	1O_2
Óxido nítrico sintasa	NO^{\bullet}
Mitocondria	$ONOO^-$

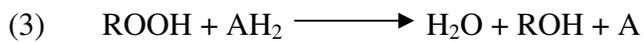
Por otra parte, para evitar los efectos tóxicos de las ERO y ERN las células cuentan con defensas antioxidantes. Se le conoce como antioxidante a cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones comparadas con aquéllas de un sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los dos tipos de sistemas antioxidantes son:

1.2. 2 Enzimáticos, entre las enzimas antioxidantes se encuentran:

a. Superóxido dismutasa (SOD). EC 1.15.1.1. Es una enzima que cataliza la descomposición del $O_2^{\bullet-}$ formando H_2O_2 (reacción 1). En el ser humano existen tres isoformas: citosólica, mitocondrial y extracelular, las cuales tienen en su centro activo uno o más metales de transición. La isoforma citosólica o SOD Cu-Zn es un homodímero con subunidades de 32 kDa que tienen un centro de Cu y Zn unidos por un residuo de histidina. La isoforma mitocondrial o SOD-Mn es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de manganeso por cada subunidad. La isoforma extracelular o SOD-EC es una glucoproteína de secreción, tetramérica, que también tiene en su centro activo Cu y Zn, la cual se encuentra en el espacio intersticial y en fluidos extracelulares como plasma, linfa y líquido sinovial (revisado en Mates y Sánchez-Jiménez 1999).

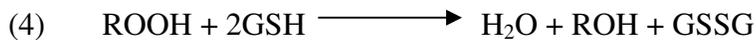


b. Catalasa (CAT). EC 1.11.1.6. Es una enzima homotetramérica de 240 kDa que contiene en cada centro activo un grupo hemo y NADPH. Tiene 2 actividades enzimáticas dependiendo de la concentración de H_2O_2 , cuando hay altas concentraciones lo descompone para formar agua y oxígeno molecular, protegiendo así a las células del peróxido de hidrógeno generado de manera endógena (reacción 2), mientras que cuando hay bajas concentraciones de H_2O_2 puede entonces reaccionar con donadores de H (reacción 3) como metanol, etanol, ácido fórmico o fenol, oxidándolos para remover peróxidos en una actividad similar a peroxidasa (revisado en Mates y Sánchez-Jiménez, 1999).

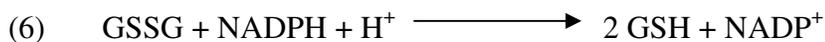


c. Glutación peroxidasa (GPX). EC 1.11.1.9. Es una enzima que contiene selenio (un residuo de selenocisteína) en cada centro activo y cataliza la reducción (reacción 4 y 5) de H_2O_2 y otros hidroperóxidos orgánicos (ROOH) utilizando glutatión reducido (GSH). En los mamíferos, se encuentra en la mayoría de los tejidos, pero existen al menos 4 isoformas cuya expresión varía dependiendo del tejido. La GPX1 (GPX celular) es una proteína citosólica, tetramérica de 4 subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 22 a 23 kDa. Se encuentra principalmente en eritrocitos, riñón e hígado; puede metabolizar H_2O_2 y otros peróxidos orgánicos como peróxidos de ácidos grasos de cadena larga y de colesterol. La GPX2 (GPX citosólica o GPX-GI) al igual que la GPX1 es tetramérica y actúa sobre los mismos sustratos, pero en la rata se encuentra principalmente en tracto gastrointestinal y en humanos sólo está presente en hígado y colon. La GPX3 (extracelular o GPX-P) es una glucoproteína con 4 subunidades de 23 a 25 kDa que se sintetiza principalmente en el riñón, en las células epiteliales de los túbulos proximales y se libera al suero por lo que además se considera un marcador de daño tubular, ya que su actividad plasmática disminuye durante la necrosis tubular aguda (Whitin y col., 1998; Whitin y col., 2002; revisado en Arthur, 2000). La GPX de hidroperóxidos y fosfolípidos (GPX4 o PHGPX) es una proteína monomérica de 20 a 22 kDa; se ha encontrado tanto en el citosol como en la fracción membranal, está presente en la mayoría de los tejidos y puede además reducir directamente los hidroperóxidos de fosfolípidos, también se diferencia de las otras GPX en que puede usar otros sustratos reductores además del glutatión. Se expresa abundantemente en células epiteliales de riñón y testículo. Aunque la GPX y la CAT comparten al H_2O_2 y otros peróxidos orgánicos como sustratos, la GPX con el ciclo redox de glutatión es la mayor fuente de protección contra niveles bajos de estrés oxidativo, mientras que la CAT se vuelve más

significativa en proteger contra un estrés oxidativo severo (revisado en Matés y Sánchez-Jiménez, 1999 y Arthur, 2000). Por otra parte, la GPX con el ciclo redox de glutatión también puede funcionar como peroxinitrito reductasa ya que se ha observado que inhibe la oxidación de dihidrorodamina 123 inducida por ONOO^- incluso de manera más efectiva que el ebselen, cabe mencionar que esta actividad se mantiene incluso cuando se induce la pérdida de su “actividad clásica” con iodoacetato (Sies y col., 1997).



d. Glutatión reductasa (GSH-Rx o NAD[P]H:GSSG oxidoreductasa). EC 1.6.4.2. Es una flavoproteína citosólica que se encuentra generalmente como homodímero constituido por subunidades de aproximadamente 55 kDa y, en el caso de la glutatión reductasa de los eritrocitos humanos, las dos subunidades están unidas covalentemente por enlaces disulfuro. Es la enzima que reduce al glutatión oxidado, generado continuamente por la acción de la GPX; para ello utiliza NADPH formándose así un ciclo redox lo que evita que se agoten las reservas de GSH (reacción 6). (Rendon y Mendoza-Hernandez, 2001).



No enzimático, entre los que se encuentran (Tabla 2):

a. Antioxidantes hidrosolubles como la vitamina C o ácido ascórbico, la cual se localiza tanto en el citosol como en el espacio extracelular; el glutatión reducido (GSH), el cual es un tripéptido formado por cisteína, glicina y glutamato, y, el ácido úrico, el cual es el producto final del metabolismo de las purinas.

b. Antioxidantes liposolubles como la vitamina E y carotenoides, que se encuentran en las membranas biológicas, y bilirrubina, esta última es el producto de la degradación del grupo hemo en mamíferos.

En el ser humano el GSH, la bilirrubina y el ácido úrico son endógenos, mientras que las vitaminas C, E y los carotenoides son obtenidos de manera exógena (revisado en Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

Tabla 2. Antioxidantes no enzimáticos y ERO/ERN que atrapan

ANTIOXIDANTE	ERO/ERN QUE ATRAPA
Vitamina C	$O_2^{\bullet-}$ OH^{\bullet}
Glutación	$O_2^{\bullet-}$ $OH^{\bullet-}$ H_2O_2
Ácido úrico	$OH^{\bullet-}$ O_3 $RO_2^{\bullet-}$ 1O_2 $ONOO^-$
Vitamina E	lipoperóxidos
Vitamina A (carotenoides)	OH^{\bullet} 1O_2
Bilirrubina	Radicales peroxilo y 1O_2
Ácido nordihidroguayarático (NDGA)	$O_2^{\bullet-}$ OH^{\bullet} $ONOO^-$ $HOCl$

Por lo tanto, en una célula continuamente se producen y se requieren las ERO y ERN, sin embargo, para su adecuado funcionamiento también deben mantener estas especies reactivas en niveles que no dañen a la célula, lo que logran gracias a las defensas antioxidantes ya mencionadas manteniendo así un equilibrio entre su producción, utilización y eliminación.

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

El estrés oxidativo (EO) o nitrosativo (EN) es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno y la defensa antioxidante conduciendo a daño celular (Sies, 1991 citado en Halliwell y Gutteridge, 1999). Puede ser el resultado ya sea de una disminución en los sistemas antioxidantes o un incremento en la producción de ERO o ERN. Como consecuencia del EO y EN se presenta el daño estructural en la célula al alterar a las diferentes biomoléculas, por ejemplo, mediante la oxidación de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, la oxidación o nitración de proteínas y, la peroxidación de lípidos, un mecanismo autocatalítico que conduce a la destrucción oxidativa de las membranas celulares dando como resultado la liberación de más metabolitos reactivos y tóxicos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (revisado en Ueda y col., 2001; revisado en Chirino y col., 2006). Para evaluar el estrés oxidativo y nitrosativo se pueden cuantificar estos marcadores. Tanto el EO como el EN se han relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades, afectando a órganos como: el cerebro, por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad vascular cerebral; al sistema cardiovascular como en el caso de la aterosclerosis, hipertensión arterial sistémica y enfermedad coronaria; pulmón, por ejemplo, en la toxicidad por ozono

(Floriano-Sánchez y col, 2006). En lo que respecta al riñón, el estrés oxidativo y nitrosativo se ha asociado tanto a insuficiencia renal crónica, como aguda de diversa etiología (revisado en Chirino y col, 2006).

2. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA) POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

2.1 RIÑÓN: ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

En el ser humano el riñón es un órgano esencial para la vida ya que es un órgano regulador que excreta y/o retiene selectivamente determinadas sustancias manteniendo así la homeostasis. Es un órgano par que mide aproximadamente 10 a 12 cm, se encuentra por detrás del peritoneo y está envuelto por una delgada cápsula de tejido fibroconectivo que se puede separar con facilidad del parénquima subyacente. En la cara interna hay una depresión, el hilio, a partir del cual se extiende dentro del órgano un espacio llamado seno renal. Todos los vasos sanguíneos que entran al riñón y salen de él, así como el uréter (conducto excretor), lo hacen por el hilio. La pelvis renal, los cálices y los vasos sanguíneos se encuentran en el seno, pero no ocupan el espacio por completo ya que está lleno de tejido conectivo adiposo areolar (revisado en Leeson y col., 1990).

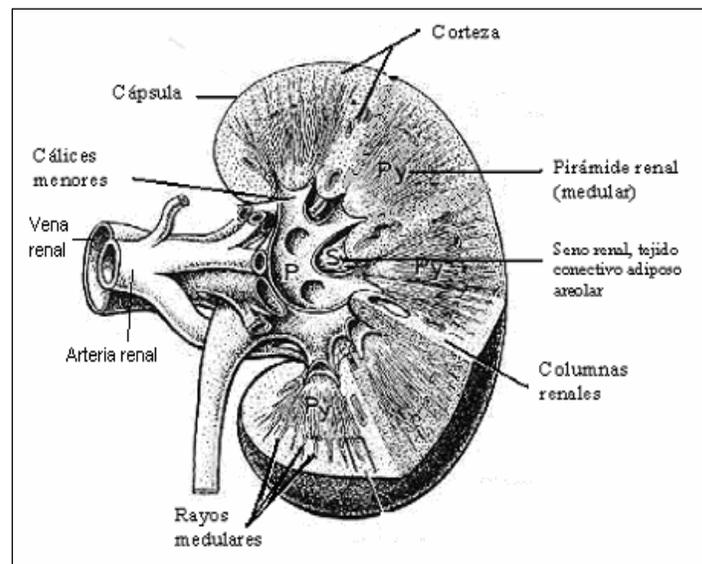


Fig. 3. Anatomía renal

El riñón tiene dos zonas, la corteza (mayoritariamente la zona externa) y la médula (predominantemente interna). La corteza renal es oscura, pardusca y de aspecto granuloso. El aspecto granuloso del parénquima cortical se explica por la presencia de cuerpos esféricos, los corpúsculos renales y de túbulos. La médula está formada por las pirámides renales, las cuales, en el riñón fresco

son de color pálido y presentan estriaciones radiadas. El aspecto estriado de la pirámide medular se debe a la presencia de túbulos rectos y vasos sanguíneos paralelos. El parénquima medular se extiende desde la base de las pirámides renales hacia la corteza en forma de rayos medulares (que contienen haces de túbulos), de forma radial, mientras que entre las pirámides medulares adyacentes, el parénquima cortical se extiende en dirección central para formar las columnas renales (Fig. 3) o de Bertin (revisado en Leeson y col., 1990).

Para llevar a cabo todas sus funciones el riñón dispone de un abundante flujo sanguíneo. Su irrigación depende de la arteria renal, rama de la aorta abdominal. La arteria renal se divide en 4 a 5 arterias interlobares, las cuales se ramifican en arterias arqueadas y éstas, a su vez, forman las arterias interlobulillares, de ellas surgen las arteriolas aferentes que forman los glomérulos y que terminan en arteriolas eferentes, las cuales formarán las arterias rectas y las redes peritubulares. Desde estas redes capilares surgen las venas que finalmente forman la vena renal que desemboca en la vena cava inferior (revisado en Schrier, 1999).

Microscópicamente, el riñón está compuesto por una gran cantidad de túbulos uriníferos, los cuales constan de dos partes: nefrona y túbulo colector (Fig. 4). La nefrona es la unidad funcional del riñón que está compuesta por: el corpúsculo renal (que corresponde al glomérulo invaginado en la cápsula de Bowman, la cual es una estructura en forma de saco), túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal. Sus funciones son: filtración, secreción y reabsorción. En el corpúsculo renal se lleva a cabo la filtración mientras que la secreción y absorción por los túbulos. Las células epiteliales del túbulo contorneado proximal realizan la reabsorción de glucosa, urea, aminoácidos, agua, proteínas de bajo peso molecular y iones como Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} (revisado en Leeson y col., 1990).

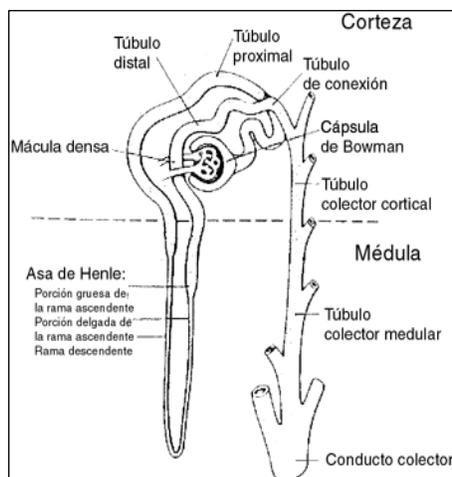


Fig. 4. Nefrona

Las principales funciones del riñón son (revisado en Holum, 2001; Guyton, 1997; Leeson y col., 1990):

1. Eliminación de productos de desecho del metabolismo, en particular compuestos nitrogenados como urea, creatinina y ácido úrico a través de la excreción de orina.
2. Regulación del equilibrio hidroelectrolítico ácido-base, a través de mecanismos para la excreción o reabsorción del exceso de agua y electrolitos.
3. Regulación de la presión sanguínea, a través de la excreción de sodio y agua, además de la secreción de renina por las células yuxtaglomerulares para conducir a la formación de sustancias vasoactivas.
4. Regulación de la eritropoyesis: el 90% de toda la eritropoyetina se forma en los riñones, sustancia que estimula la producción de glóbulos rojos ante estímulos como la hipoxia.
5. Metabolismo de la vitamina D: se hidroxila el 25-hidroxicolecalciferol proveniente del hígado para transformarlo en el metabolito activo de la vitamina D, el 1,25-dihidroxicolecalciferol.

2.2 INSUFICIENCIA RENAL AGUDA

La insuficiencia renal es el estado patológico en el que el riñón es incapaz de cumplir sus funciones de eliminación de productos de desecho así como de mantener constante y normal el medio interno y endócrino. Cuando se establece de forma súbita en riñones en principio normales, es conocida como insuficiencia renal aguda (IRA). La IRA se caracteriza principalmente por la disminución abrupta del filtrado glomerular y, en consecuencia, retención de productos nitrogenados en la sangre; además, se puede acompañar también de oliguria; se clasifica en prerrenal, intrarenal y posrenal, de acuerdo a las causas que la originan. La IRA prerrenal es la que se establece en los casos de déficit o pérdida de volumen circulatorio, cuando por estar reducida la perfusión renal, disminuye la presión hidrostática en los capilares glomerulares y, con ello, disminuye la cantidad de filtrado pero por otra parte se activan mecanismos para aumentar la volemia promoviendo la absorción de sodio y agua en los túbulos. La azoemia y la oliguria resultantes son consecuencia de la disminución del filtrado glomerular y, también, de la intensa absorción tubular de agua. En cuanto a la composición de la orina, la concentración de sodio y su excreción fraccional son bajas por el aumento de la absorción de este ion en los túbulos; la concentración de creatinina y osmolaridad urinarias son altas ya que los túbulos absorben ávidamente agua y sodio pero no creatinina ni otras sustancias. La IRA intrarenal es la más frecuente y se presenta como consecuencia de una agresión directa al parénquima renal (túbulos o glomérulos renales) donde la más común es la desencadenada por la necrosis de las células tubulares (necrosis tubular aguda) ya

sea ocasionada por agentes tóxicos como antibióticos (por ejemplo cefalosporinas o aminoglucósidos como la gentamicina), metales pesados (medios de contraste) o, bien, por depósito de sustancias endógenas como hemoglobina y mioglobina; otra causa importante de IRA intrarenal es la isquemia ocasionada por oclusión vascular. A diferencia de la IRA prerenal en este caso debido a que existe lesión tubular, la concentración y excreción fraccional de sodio en orina están aumentados, mientras que la osmolaridad urinaria se encuentra disminuida. Finalmente, la IRA posrenal se debe a obstrucción de las vías urinarias (revisado en Castro del Pozo, 2000; Schrier, 1999).

2.3 ISQUEMIA / REPERFUSIÓN (IR)

2.3.1 Importancia Clínica

La lesión isquémica es una causa importante de daño renal pues se encuentra en cerca del 50% de los pacientes con IRA (Deng y col., 2001). La IRA por isquemia/reperfusión se puede presentar en la práctica clínica como consecuencia de: la hipoperfusión sistémica con las subsecuentes medidas de resucitación circulatoria, es decir, en el estado de choque o hipotensión severa; la hipoperfusión renal local posterior al pinzamiento aórtico durante la cirugía de aneurisma abdominal; o posterior al trasplante renal (Weight y col., 1996; Vázquez-Milanés y col., 2002; Schwarz y Oberbauer, 2003).

2.3.2 Concepto

La isquemia se define como la pérdida del aporte sanguíneo a los tejidos debido a alteraciones en el flujo arterial o a reducción del drenaje venoso, esto reduce el aporte de oxígeno a la célula (hipoxia). También compromete la disponibilidad de sustratos metabólicos (aportados por el flujo sanguíneo), entre ellos la glucosa. Por lo tanto, los tejidos isquémicos ante la falta de oxígeno primero pueden continuar con la producción de energía de forma anaeróbica pero ésta también se interrumpe una vez que se agotan los sustratos para la glucólisis o cuando queda inhibida por la acumulación de metabolitos (revisado en Cotran y col., 2000). Sin embargo, a pesar de que la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) es esencial para la supervivencia del tejido isquémico, se ha encontrado que paradójicamente por sí misma es también inductora de daño (Jefayri y col., 2000; Dalsing y col., 1983). Por lo que se han descrito diversos mecanismos de daño implicados en la IR y uno de ellos es la producción de ERO y ERN.

2.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO COMO MECANISMO DE DAÑO EN LA ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN RENAL

En el riñón sometido a IR se ha demostrado un papel importante del estrés oxidativo y del estrés nitrosativo pues se ha encontrado que, por una parte, las defensas antioxidantes disminuyen tanto durante la isquemia (Ferrari y col., 1985) como después del periodo de IR, en especial las actividades de SOD total, SOD CuZn, GPX y CAT (Singh y col., 1993; Dobashi y col., 2000) y, por otra, hay un aumento en la producción de especies reactivas durante la reperfusión, principalmente OH^\bullet , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y ONOO^- (Baker y col., 1985; Kadkhodae y col., 1995; Vanden y col., 1997; Tan y col., 1995; Bhaskar y col., 1995; Noiri y col., 2001). Entre las principales fuentes de ERO y ERN que se han identificado se encuentran:

a. Xantina oxidasa. McCord propuso que la fuente primaria de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en los tejidos reperfundidos es la enzima xantina oxidasa (revisado en Ueda y col., 2001). La xantina oxidoreductasa es una enzima que lleva a cabo la oxidación de purinas, pero puede existir en las células en dos formas interconvertibles: como xantina deshidrogenasa (XHD) (EC 1.1.3.22), conocida también como oxidasa tipo D dependiente de NAD^+ , que es la forma predominante (Sanhueza y col., 1992; Greene y Paller, 1992); o bien, durante condiciones de hipoxia, mediante la acción de proteasas puede existir como xantina oxidasa tipo O (XO) (EC 1.1.1.204), la cual utiliza O_2 en lugar de NAD^+ como aceptor de electrones (Greene y Paller, 1992; revisado en Hannah y col., 2004; Martin y col., 2004). Se ha encontrado que la actividad de la enzima xantina oxidasa tipo O se incrementa durante la reperfusión en los riñones isquémicos (Tan y col. 1995) y durante la hipoxia-reoxigenación en células epiteliales del túbulo proximal renal (Greene y Paller, 1992). Su papel en el daño renal por IR se explica porque durante la isquemia hay una disminución masiva de la reserva de nucleótidos de adenina (ATP) con un incremento en su degradación, donde la adenosina es convertida a inosina y luego a hipoxantina (sustrato de la XO), resultando en acumulación de esta última (Akctin y col., 1999; Okabe, 1996). Por otra parte, después del periodo de isquemia, hay un aumento de la forma XO, por lo que, después de la reperfusión, cuando el oxígeno molecular se reintroduce a los tejidos, ocurre un incremento de la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Akctin y col., 1999; Sanhueza y col., 1992; Greene y Paller, 1992). También, se ha encontrado que ambas enzimas son productoras de ERO al oxidar el NADH, el cual se acumula también durante la isquemia, por lo que, no es necesaria la conversión de XDH a XO para inducir daño (Zhang y col., 1998; Maia y col., 2005).

b. Mitocondrias. Con la pérdida del oxígeno molecular durante la isquemia, se inhibe la transferencia de electrones, lo cual lleva a una alta reducción de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Zhu y col., 2007; revisado en Li y Jackson, 2002). Por lo que, durante la reperfusión ocurre un estallido de producción de $O_2^{\bullet-}$ debido a la autooxidación de los complejos I, II y III. El $O_2^{\bullet-}$ puede dismutar a H_2O_2 el cual difunde fuera de la mitocondria y puede estimular la producción de más ERO en otras mitocondrias vecinas (Zorov y col., 2006). Además, pueden reaccionar con otras proteínas de la cadena respiratoria que contengan centros Fe-S (revisado en Ueda y col., 2001; Li y Jackson, 2002; Turrens, 2003).

C. NADPH oxidasa. Las especies reactivas no sólo son producidas por las células propias del riñón sino también por células inflamatorias que se activan y llegan como respuesta al daño celular renal. Así pues, los neutrófilos contribuyen al aumento del daño debido a que participan en la formación de ERO a través de la activación de la NADPH oxidasa. Aunque cabe mencionar que la NADPH oxidasa también es una fuente de $O_2^{\bullet-}$ en el riñón mismo, ya que se encuentra en las células endoteliales, en los podocitos, en las células tubulares y de músculo liso, entre otras (Ueda y col., 2001; Gill y Wilcox, 2006; Coyle y col., 2006).

d. Sintasa de óxido nítrico (NOS). La NOS pertenece a una familia de enzimas que sintetizan NO^{\bullet} a partir de arginina, O_2 y NADPH utilizando tetrahidrobiopterina (THB) como cofactor (revisado en Chirino y col., 2006). Aunque su producto principal, el NO^{\bullet} , juega un papel importante en la fisiología celular, también se ha encontrado que la inhibición de la enzima, en especial de la isoforma inducible, se asocia con un menor daño renal (Komurai y col., 2003; Chatterjee y col., 2003; Chatterjee y col., 2002; Noiri y col., 2001; Mark y col., 2005). Esto se ha explicado porque el NO^{\bullet} al reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ forma $ONOO^-$ el cual es una especie muy reactiva capaz de inducir lipoperoxidación o daño oxidativo al DNA (Noiri y col., 2001; revisado en Goligorsky y col., 2002) e incluso al propio cofactor, la THB (Milstien y Katusic, 1999). Por otra parte, se ha observado que ante una deficiencia de THB, la NOS desacoplada es capaz de producir $O_2^{\bullet-}$ (Milstien y Katusic, 1999; Coyle y col., 2006; Gao y col., 2007).

Sin embargo, independientemente de su origen, las ERO y ERN tienen una participación importante en el daño renal inducido por isquemia y reperfusión, donde se ha encontrado un aumento en la lipoperoxidación (Seujang y col., 2006; Akcetin y col., 2000; Eschwege y col., 1999), así como en la

oxidación y nitración (Fig. 5) de proteínas (Noiri y col., 2001). Por ejemplo los niveles de MDA en el riñón aumentan con tan solo 15 min de isquemia alcanzando una concentración máxima con un periodo de 30 min (Seujang y col., 2006). También, se ha reportado un mayor incremento de MDA a los 5 min de reperfusión con 40 min de isquemia o también a los 10 y 15 min de reperfusión con 60 min de isquemia (Akçetin y col., 2000; Grekas y col., 1996), mientras que los aductos de 4-HNE en proteínas pueden ser detectados después de 30 min de isquemia en la corteza y con 45 y 60 min también en la médula (Eschwege y col., 1999). Como consecuencia, se ha observado que las especies reactivas pueden degradar la membrana basal glomerular alterando la función glomerular y tubular (Baud y Ardaillou, 1986). Por otra parte, la diferencia en la distribución y regulación de enzimas antioxidantes en las células tubulares de riñón puede ser un factor importante en la susceptibilidad al daño, pues se ha observado que el daño por IR lesiona preferentemente a los túbulos proximales más que a los distales. Esto último puede estar relacionado a que la expresión genética de SOD está regulada a la alta en las células de los túbulos distales, mientras que está regulada a la baja en las células de los túbulos proximales (revisado en Ueda y col., 2001).

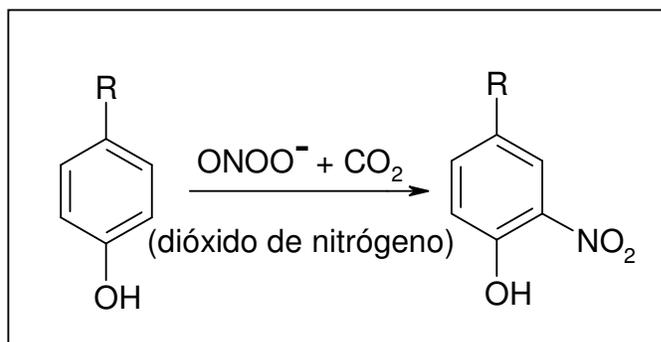


Fig. 5. Especies derivadas de ONOO^- , como el dióxido de nitrógeno, reaccionan con residuos de aminoácidos de las proteínas (por ejemplo de tirosina) provocando su nitración.

Además, se ha demostrado de manera indirecta el papel importante del estrés oxidativo y nitrosativo en la patogénesis del daño por IR al utilizar diversas estrategias antioxidantes con las cuales se ha observado prevención o protección parcial del daño. Por ejemplo, se ha encontrado que la susceptibilidad al daño por IR es mayor con una dieta deficiente en vitamina E y en selenio, y menor cuando se induce la sobreexpresión de SOD en ratones. En el caso de la dieta deficiente en selenio se asoció a una marcada reducción de glutatión peroxidasa. Por otra parte, la inhibición de la catalasa resulta en una exacerbación del daño en este mismo modelo (revisado en Ueda y col., 2001). También, el uso de inhibidores de la peroxidación de lípidos ha demostrado reducir la formación de radicales

libres, peroxidación de lípidos y disfunción renal (Sorensen y col., 1996). Otras estrategias antioxidantes que se han reportado como protectores ante el daño renal por IR son el uso de SOD (Konya y col., 1991), dimetiltiourea (Kadkhodae y col., 1995), PBN (Pedraza-Chaverri y col., 1992), N-acetilcisteína (Erdogan y col., 2006; Sehirli y col., 2003), vitamina E (Avunduk y col., 2003; Rhoden y col., 2001), tempol (Chatterjee y col., 2000), ebselen (Goligorsky y col., 2002; Noiri y col., 2001), inhibidores de la iNOS como la aminoguanidina (Sahna y col., 2006) o L-NIL (Chatterjee y col., 2002) y extractos de algunas plantas como el ginko biloba (Sener y col., 2005) y el extracto acuoso de ajo (Kabasakal y col., 2005).

3. AJO Y S- ALILCISTEINA (SAC)

3.1 AJO

El *Allium sativum* L., conocido comúnmente como ajo, ha sido objeto de múltiples investigaciones en los últimos veinte años ya que es una planta utilizada ampliamente en la medicina tradicional, uso en el que se le han atribuido diversas propiedades curativas. Entre los numerosos componentes del ajo destacan: 1) los compuestos que contienen selenio, ya que el ajo es uno de los vegetales con mayor contenido de selenio, aunque puede variar desde 0.28 µg/g de peso fresco habitualmente hasta 50 µg/g de peso fresco cuando es cultivado en suelos enriquecidos (Block y col., 1996; revisado en Lawson, 1993; revisado en Lawson, 1998) y 2) compuestos organosulfurados, los cuales son los más abundantes ya que el contenido de azufre en el ajo es de 3 mg/g, cantidad cuatro veces mayor que en otros vegetales; la gran mayoría de estos compuestos contienen cisteína y se encuentran como dos clases de compuestos en los dientes de ajo intactos, S-alkylcisteína sulfóxidos y γ -glutamil-S-alkylcisteínas. Gran parte de la investigación del ajo se ha centrado en estos compuestos, ya que, además de ser los más abundantes, son los que han mostrado tener actividad farmacológica a las dosis que representarían una ingestión habitual de ajo. El 80% de los sulfóxidos de cisteína corresponden a alicina en cantidades de 10 mg/g de peso fresco o 30 mg/g de peso seco (Block y col., 1996; Lawson, 1993), mientras que en el grupo de las γ -glutamilcisteínas podemos encontrar, por ejemplo, la γ -glutamil-S-allylcisteína y la γ -glutamil-S-t-1-propenilcisteína (Fig. 6). El contenido de los diversos compuestos organosulfurados varía con el procesamiento del ajo; así pues, al cortar o machacar el ajo fresco, o bien cuando el polvo de ajo entra en contacto con una solución acuosa, los compuestos de la clase de los sulfóxidos pueden dar lugar a tiosulfonatos. El tiosulfonato más abundante es la alicina, responsable del olor del ajo,

formada a partir de la alina por la enzima alinasa. También, a partir de los tiosulfatos se pueden obtener compuestos liposolubles como las vinilditiinas, el ajoeno o los polisulfuros entre los que se encuentran el dialilsulfuro, el dialildisulfuro y el dialiltrisulfuro (revisado en Block, 1985). Por otra parte, los compuestos del grupo de γ -glutamyl-S-alkylcisteinas no se modifican con el machacamiento, pero pueden ser una reserva para la formación adicional de alina durante un periodo de almacenamiento del ajo o, bien cuando se incuban por tiempos prolongados en soluciones acuosas pueden dar lugar a la formación de otros compuestos, por ejemplo, S-1-propilcisteína o S-alilcisteína (SAC), por medio de la acción de transpeptidasas (revisado en Lawson, 1998).

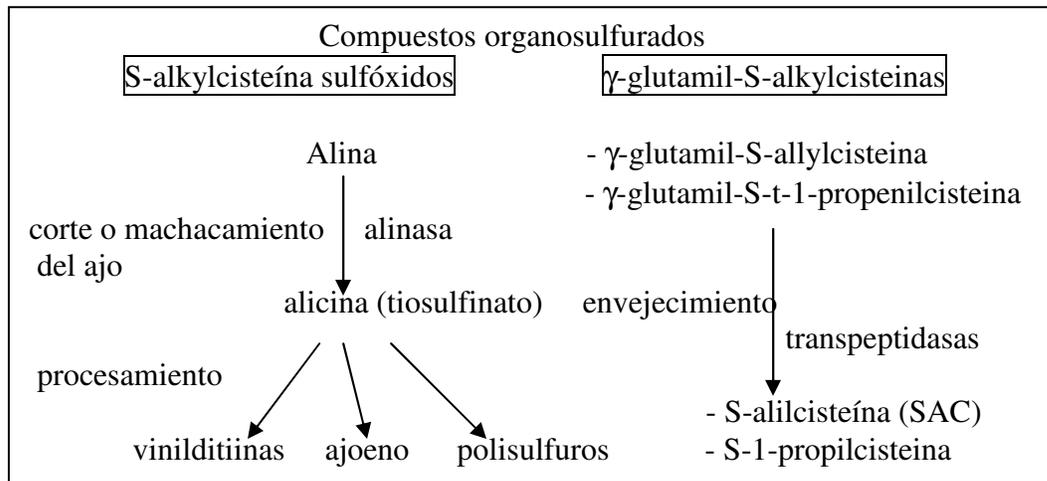


Fig. 6. Algunos de los principales compuestos organosulfurados y productos derivados de su procesamiento.

3.2 S-ALILCISTEINA Y SU FARMACOCINÉTICA

La S-alilcisteína (SAC) es uno de los compuestos organosulfurados hidrosolubles que se encuentra en muy pequeñas cantidades en el ajo intacto (no exceden los 30 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco), sin embargo su contenido aumenta considerablemente en otras preparaciones, como el extracto de ajo envejecido (Kodera y col., 2002). La SAC puede formarse en una preparación acuosa a través de la hidrólisis de la γ -glutamyl-S-alilcisteína, la cual existe en el ajo crudo como precursor de la SAC (Kodera y col., 2002) o, también, puede ser sintetizada a partir de L-cisteína y bromuro de alilo (Fig. 7) y purificada por recristalización con agua y etanol (Nagae y col., 1994; Maldonado y col., 2003):

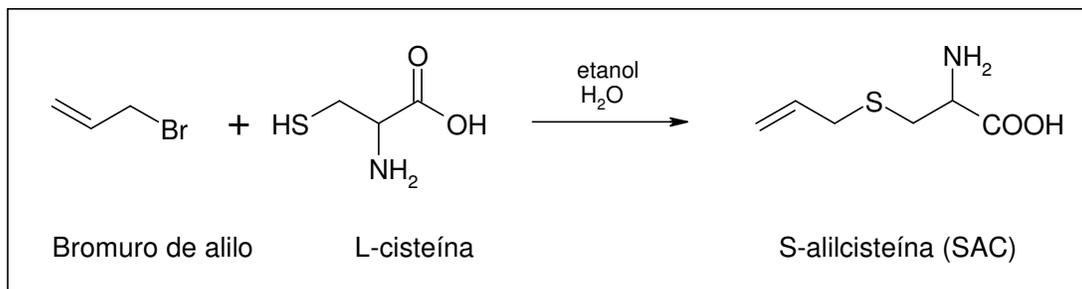


Fig.7. Reacción de síntesis y estructura química de la SAC

La SAC es un compuesto que por sus propiedades fisicoquímicas es muy estable ya que en una solución acuosa permanece como tal alrededor de dos años (Kodera y col., 2002). En cuanto a su farmacocinética se absorbe fácil y rápidamente en el tracto gastrointestinal y se distribuye principalmente en plasma, hígado y riñón (Yan y Zeng, 2005; Nagae y col., 1994). Su toxicidad es muy baja en ratas y ratones, aunque mayor en hembras que en machos, ya que la dosis letal 50 (DL₅₀) por vía oral en ratas macho es de 10.9 g/Kg y 9.5 g/Kg en hembras, mientras que por vía intraperitoneal es de 3.34 g/Kg tanto en hembras como en machos. (Kodera y col., 2002). Su vida media y de excreción son mayores a 10 y 30 horas respectivamente tras una administración oral (Kodera y col., 2002). En ratas, su biodisponibilidad es de 98.2 %, con una dosis oral de 50 mg/Kg (Nagae y col., 1994), aunque se ha encontrado que dependiendo de la dosis puede variar desde 96.8% con 25 mg/Kg a 91.0% con 100 mg/Kg en ratas (Yan y Zeng, 2005). Nagae y col. encontraron que en ratas, la SAC se excreta en la orina principalmente como N-acetil-SAC (aproximadamente del 30 al 50% de la dosis) y menos del 1% como SAC, sugiriendo que la principal forma de eliminación de la SAC es a través de su metabolismo hacia la forma N-acetil SAC, por medio de la acetiltransferasa localizada en hígado y riñón. Sin embargo, observaron que cuando la SAC es eliminada del hígado aún se mantiene una concentración relativamente alta en el riñón, por lo que sugieren que la SAC sea transformada a N-acetil-SAC por la acetiltransferasa en el hígado, posteriormente una porción de N-acetil-SAC podría convertirse nuevamente a SAC en el riñón por una acilasa, y que adicionalmente ocurra reabsorción renal de SAC. Por otra parte, en ratones se ha encontrado que se excreta tanto como SAC como N-acetil-SAC, mientras que en humanos, no se ha encontrado este último metabolito en la orina (Kodera y col., 2002; Nagae y col., 1994).

Además, en ratas se ha encontrado que después de la administración oral de SAC, la máxima concentración en plasma alcanzada depende de las dosis administradas: con 12.5 y 25 mg/Kg se alcanza una concentración máxima a los 30 min, de 8.44 y 18.12 µg/ml respectivamente, mientras que

con 50 mg/Kg se alcanzan 36.85 $\mu\text{g/ml}$ en 1 hora, después de estos tiempos los niveles plasmáticos disminuyen rápidamente tras la administración oral, mientras que con la administración intravenosa lo hacen de forma más lenta (Nagae y col., 1994). Las concentraciones de SAC en los diferentes órganos (corazón, pulmón, hígado y riñón) son variables, pero a los 15 min tras su administración, el riñón es el que tiene la mayor concentración (con dosis única vía oral de 25 mg/Kg en ratas) y se mantienen niveles cercanos por aproximadamente 1 hora (Nagae y col., 1994; Yan y Zeng, 2005).

3.3 SAC COMO ANTIOXIDANTE

Se ha encontrado que la SAC, es uno de los compuestos biológicamente activos del ajo ya que ha demostrado tener propiedades antioxidantes en diversos modelos de enfermedad donde el estrés oxidativo juega un papel importante, incluyendo órganos como cerebro, corazón, estómago e hígado (Ito y col., 2003a.; Kosuge y col., 2003; La Cruz y col., 2006; Lin y col., 2004; Mostafa y col., 2000; Nakagawa y col., 1998; Pérez-Severiano y col., 2004a,b; Sundaresan y Subramanian, 2003). Así pues, existen estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, donde se observan sus propiedades protectoras ante el daño oxidativo e incluso nitrosativo, algunos de los cuales se resumen en la Tabla 3. Sin embargo, sólo recientemente se ha estudiado de forma más específica su capacidad atrapadora de ERO (Ide, 1999; Medina-Campos y col., 2007) reportada como concentración inhibitoria media (CI_{50}), que es la concentración a la cual la SAC es capaz de atrapar el 50% de las ERO producidas en un sistema durante un ensayo específico. Entre las ERO así caracterizadas (Medina-Campos y col., 2007) se encuentran el $O_2^{\bullet-}$ ($CI_{50}=14.49$ mM), H_2O_2 ($CI_{50}=68$ mM), OH^{\bullet} ($CI_{50}=0.68$ mM), $HOCl$ ($CI_{50}=2.86$ mM) y 1O_2 ($CI_{50}=1.93$ mM).

Tabla 3. Modelos donde se ha asociado el estrés oxidativo y se ha encontrado efecto protector de SAC.

REFERENCIA Y MODELO	EFEECTO/ DOSIS/ FORMA DE ADMINISTRACIÓN
Numagami y col., 1996. Isquemia cerebral, ratas.	Atenuó la cantidad de ERO a los 20 min de la reperusión aunque no a los cinco min (300 mg/Kg/ip/30 min antes de la isquemia).
Numagami y Ohnishi 2001. Isquemia cerebral, ratas.	Inhibe la producción de radicales libres (aductos de PBN/radical alcóxilo), la peroxidación de lípidos (TBARS) y el daño neuronal. El área de infarto se redujo con 300 mg/Kg (dosis utilizadas: 100, 300, 600 mg/Kg/ip/ 30 min antes de la isquemia).

Nishiyama y col., 2001. Ratones con envejecimiento acelerado	Mejora el déficit de aprendizaje y memoria (40 mg/Kg como dieta suplementada por ocho meses).
Sundaresan y Subramanian, 2003. Carcinogénesis hepática, ratas.	Previene la presentación de cáncer; en plasma y eritrocitos disminuye la peroxidación de lípidos (TBARS) y previene la disminución de GSH. Previene la disminución de vitamina C, E y A en plasma y la disminución de las actividades de SOD, GPX y CAT en eritrocitos (200 mg/Kg en días alternos vía oral por sonda; simultáneo a la administración del cancerígeno por seis semanas).
Lin y col., 2004. Dieta hiperlipídica, ratones	Restaura la actividad de GPX en hígado (SAC 99% 1 g/L en el agua de beber durante cuatro semanas).
Hsu y col., 2004. Diabetes, ratones	Restaura el nivel de glutatión, reduce la formación de MDA y mejora la actividad de CAT y GPX en riñón e hígado (SAC 99% 1 g/L en el agua de beber durante cuatro semanas).
Maldonado y col., 2003. IRA por gentamicina, ratas.	Disminuye los marcadores de daño funcional y estructural renal. Previene la oxidación de proteínas y la disminución de la actividad de SOD, GPX y GR (250 mg/kg/ip/24 h antes de la administración de gentamicina y 125 mg/kg/ip/12h/cuatro días).
Pérez-Severiano y col, 2004a. Neurotoxicidad por ácido quinolínico (AQ), ratas. (Enfermedad de Huntington).	Inhibió la peroxidación de lípidos (con la dosis más baja). La dosis intermedia disminuyó el daño oxidativo asociado a disminución de la formación de ERO y la lipoperoxidación, también previno la disminución de la actividad de SOD-CuZn, disminuyó la neurotoxicidad (comportamiento) y las alteraciones morfológicas (dosis utilizadas: 100, 300, 450 mg/Kg/ip/30 min antes del AQ).
Geng y col., 1997. Toxicidad inducida por TNF α y H ₂ O ₂ Células T humanas	Inhibe la activación del NF kappa β . Preincubación con 0.5, 1, 1.5 y 2 μ g/ml de SAC por 24 h.
Peng y col., 2002. Apoptosis inducida por péptido β amiloide (A β) en células PC12 (Alzheimer)	Suprimió la generación de ERO (H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-}), atenuó la activación de caspasa-3, la fragmentación de DNA, protege contra la apoptosis inducida por A β . Pretratamiento por 24 h con 0.5, 1, 2, 4 μ g/ml.

Ide y Lau, 1997. Daño endotelial inducido por LDL oxidadas (aterosclerosis)	Previno el daño a membrana (liberación de DHL), la pérdida de viabilidad celular y la peroxidación de lípidos (TBARS). Preincubación por 24 h con 0.1, 1, 10, 20 mM.
Kim y col., 2001. Producción de NO [•] por células endoteliales y macrófagos (aterosclerosis)	Inhibe la producción de NO [•] , la expresión de iNOS y la activación de NF-k B en macrófagos. Incrementó la producción de GMPc sin afectar la actividad, expresión o distribución subcelular de eNOS. Coincubación por 16 h con 20, 40, 80 μM.
Ide y Lau, 2001. Estrés oxidativo intracelular y activación del factor nuclear kB (aterosclerosis)	Protege a las células endoteliales de las Ox-LDL al prevenir la depleción de GSH, minimiza la liberación de peróxidos (H ₂ O ₂ y peróxidos lipídicos, medidos por fluorescencia), inhibe la activación de NFkB inducida por H ₂ O ₂ o TNFα; inhibe la peroxidación de lípidos (TBARS). Preincubación por 24 h con 0.1, 1, 10, 20 mmol/L.
Ide y Lau, 1999. Estrés oxidativo en células endoteliales inducido por LDL oxidadas (aterosclerosis)	Previene la liberación de DHL (índice de daño a la membrana) y la depleción intracelular de GSH. Inhibe la liberación de peróxidos. En un sistema libre de células, atrapa H ₂ O ₂ . Preincubación por 24 h de 0.1, 1, 10, 20 mM.
Morihara y col., 2005. Hemólisis inducida por ONOO ⁻	Disminuye la hemólisis inducida por ONOO ⁻ . Concentraciones usadas: 1 a 10 mM.

DHL: deshidrogenasa láctica. TBARS: sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

II. JUSTIFICACIÓN

La SAC ya ha sido descrita como un compuesto hidrosoluble con propiedades antioxidantes, sin embargo, aún no está bien caracterizada su capacidad atrapadora de peroxinitrito en un sistema *in vitro*, por lo que, determinar su CI_{50} y compararla con las de otros compuestos de referencia nos permitiría conocer más sobre su potencia antioxidante y apoyaría su uso en el modelo de enfermedad de isquemia y reperfusión. Por otra parte, la lesión por isquemia es la más frecuente en la medicina clínica y generalmente está asociada a un periodo de reperfusión; en particular en los pacientes con insuficiencia renal aguda (IRA), se ha observado que alrededor del 50% de ellos presentan daño por isquemia y, dado que existe amplia evidencia que demuestra el papel de las ERO y ERN como mediadores importantes en el daño tisular por IR renal, se justifica evaluar como estrategia de protección a la SAC por ser un compuesto antioxidante económico, estable, de toxicidad muy baja, con excelentes propiedades farmacocinéticas que pudiera ser utilizado en la práctica clínica para prevenir el daño renal inducido por IR.

III. HIPÓTESIS

Si ya se ha demostrado que la SAC protege del daño celular asociado a $ONOO^-$, se espera que sea capaz de atraparlo directamente en un sistema *in vitro*. Además, ya que la SAC tiene capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, se espera que dicho compuesto tenga un efecto protector sobre la función renal y sobre marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en el daño renal inducido por IR.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar la capacidad atrapadora de peroxinitrito de la SAC en un sistema *in vitro*.
- Determinar si la SAC atenúa el daño renal por isquemia-reperfusión.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Medir la capacidad atrapadora de peroxinitrito de la SAC mediante el ensayo con DHR 123.
- Evaluar el efecto de la SAC sobre la función renal de ratas sometidas a IR renal mediante la determinación sérica de BUN y creatinina, y sobre el daño estructural a través de microscopia de luz.
- Evaluar si la SAC modifica los marcadores de estrés oxidativo y el sistema antioxidante en el tejido renal por medio de la determinación de proteínas oxidadas, inmunohistoquímica (nitrotirosina y 4-HNE) y actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Medir la capacidad atrapadora de peroxinitrito de la SAC mediante el ensayo con DHR 123.
- Evaluar el efecto de la SAC sobre la función renal de ratas sometidas a IR renal mediante la determinación sérica de BUN y creatinina, y sobre el daño estructural a través de microscopia de luz.
- Evaluar si la SAC modifica los marcadores de estrés oxidativo y el sistema antioxidante en el tejido renal por medio de la determinación de proteínas oxidadas, inmunohistoquímica (nitrotirosina y 4-HNE) y actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES:

1.1 Reactivos: la SAC fue donada por la Dra. Perla Maldonado (010205 No.lote 15; 18/sep/06). Se preparó en solución salina o agua desionizada a concentración de 50 mg/mL (0.3 M). El pentobarbital sódico se obtuvo de Pfizer (Toluca, Edo. de México). Se utilizaron estuches comerciales para la determinación de BUN, obtenido de Spinreact (Sant Esteve de Bas, España), y de creatinina obtenido de Bayer (CAT. B014569-01). La albúmina sérica bovina (ABS), la glutatión reductasa, el NADPH y el GSH se obtuvieron de Sigma (St Louis Mo, EUA). La azida de sodio fue obtenida de Merck (Alemania). El ácido tricloroacético, el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), sales de amortiguadores de fosfatos, ácido clorhídrico (HCl), etanol, acetato de etilo y xilenos fueron de JT Baker (México, DF). El ácido dietilen triamino pentaacético (DTPA) se obtuvo de Sigma. La dihidrorodamina 123 (DHR 123) de Cayman Chemical Company CAT. 85100 Lot. 15459-10200415/Ago/05. La DL-Penicilamina, el nitrato de potasio, el dióxido de manganesio, el dimetil sulfóxido (DMSO) y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) de Sigma (St. Louis MO, EUA). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el carbonato de sodio (Na₂CO₃) se adquirieron de Mallinckrodt (México, D.F.). El Tritón X-100, la leupeptina, pepsitina A, aprotinina, sulfato de estreptomicina, 2,4-

dinitrofenilhidrazina (DNPH), guanidina-HCl se adquirieron de Sigma (St. Louis MO, EUA). La xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT) y la xantina oxidasa (Lote 074K3795) se obtuvieron de Sigma (St. Louis MO, EUA). El sulfato de amonio ((NH₄)₂ SO₄) y el cloruro de cobre (CuCl₂H₂O) se obtuvieron de JT Baker (México, D.F.). El polvo de ajo se obtuvo de McCormick y se utilizaron también dientes de ajo fresco. Se utilizó hematoxilina de Mayer (modificación de Lillie); la eosina y la diaminobenzidina de DAKO Corporation (Carpinteria, CA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) fue de Oxis International Inc. (Portland, OR, USA). El anticuerpo de ratón monoclonal anti-3-nitrotirosina (3-NT) se adquirió de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). El anticuerpo secundario de cabra biotinilado SP-conjugado Affini Pure se adquirió de Jackson ImmunoResearch, Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA). También se utilizó un estuche comercial (Vectastain-ABC) para la inmunohistoquímica.

1.2 Equipo: se utilizaron un homogenizador tipo politrón Brinkman, una centrífuga de mesa no refrigerada IEC HN-SII con rotor r=13.1 cm, microcentrífugas Beckman de mesa (Microfugga R con rotor r=8 cm) y de piso (J2-21 con rotor r= 10.5 cm), espectrofotómetro Beckman y un autoanalizador Bayer RA1000. También un microtomo de rotación Leica RM 2145, microscopio de luz Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Alemania), un analizador de imagen computarizado KS-300 3.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) y una cámara acrílica de CO₂.

1.3 Animales: se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 200-220 g de peso, las cuales se mantuvieron en cajas colectivas con libre acceso a agua y alimento, expuestas a ciclos artificiales de luz-oscuridad de 12 h. Se asignaron de forma aleatoria a cada uno de los tres grupos.

2. MÉTODOS

A. Estudio *in vitro*

a. Preparación de los extractos de ajo:

Extracto de polvo de ajo: se preparó una solución de 0.1 g/mL a partir de polvo de ajo y agua desionizada, se agitó en vórtex por 10 min y posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min a 4°C, obteniendo así el sobrenadante, el cual fue utilizado para el ensayo.

Extracto de ajo crudo: se preparó a una concentración de 0.2 g/mL. Para ello primero se calculó la cantidad de agua a agregar: se pesó el diente de ajo y se le restó el contenido de agua (70% del peso total) para conocer el peso correspondiente a agua y sólidos, a partir del peso de sólidos se calculó cuánta agua necesitaba añadir para obtener la concentración de 0.2 g/mL, pero a este cálculo se le restó el peso correspondiente a agua del diente de ajo. Enseguida se picó el diente de ajo, se homogenizó en el politrón con la cantidad de agua calculada y finalmente se centrifugó a 15,000 g durante 10 min a 4°C para obtener el sobrenadante el cual se utilizó para el ensayo.

b. Síntesis de peroxinitrito: Para la síntesis de ONOO^- , se mezclaron simultáneamente 5 mL de una solución ácida (0.6 M HCl) de H_2O_2 (0.7 M) y 5 ml de NaOH 1.2 M en una solución acuosa de KNO_2 (5 mL), manteniendo en hielo y en agitación. Se obtuvo así el ONOO^- que es un líquido color amarillo intenso, el cual se pasó a través de una columna de MnO_2 (lavada previamente con NaOH 1.2 M) para remover H_2O_2 residual. Se almacenaron varias alícuotas a -20°C hasta su utilización en el ensayo, las cuales tenían una concentración aproximada de 30 a 50 mM (la concentración de ONOO^- se determinó antes de cada ensayo a 302 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de $1.670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Beckman y col, 1994).

c. Preparación de soluciones/reactivos para el ensayo:

1. Se preparó una alícuota de DHR 28 mM en DMSO (la cual se almacenó a -20°C y protegida de la luz hasta el momento del ensayo).
2. A partir de esta alícuota se preparó una solución de trabajo de DHR 50 μM en agua desionizada (la cual se mantuvo en hielo y cubierta de la luz durante el ensayo).
3. Se preparó DPTA 1 mM en amortiguador fosfatos 0.1 M pH 7.4.
4. Se prepararon diluciones de los compuestos de referencia y muestras (la SAC, pencilamina y extractos de ajo se prepararon en agua desionizada, mientras que el NDGA en DMSO).

5. Se preparó una dilución de peroxinitrito en NaOH 0.3 M, dependiendo de la concentración de la alícuota para obtener una concentración final en el ensayo de 15 a 25 μM . Generalmente se diluyó 1:40 (por lo tanto usé una dilución final en el ensayo 1:2,000).

d. Fundamento del ensayo: Se utilizó un método espectrofotométrico para evaluar la actividad atrapadora de ONOO^- de la SAC, monitorizando la oxidación de DHR 123 a 500 nm, la cual es un compuesto poco soluble en soluciones acuosas pero soluble en solventes orgánicos, que al ser oxidada por ONOO^- , se convierte en un compuesto fluorescente, la rodamina 123 (Fig. 8) que absorbe a 500 nm (Crow, 1997; Wrona y col., 2005). Por ello, detectar menos rodamina 123 indicaría que el compuesto que se use como antioxidante en el ensayo está evitando la oxidación por ONOO^- , es decir, tendría un efecto atrapador. El ensayo consistió en una modificación de la técnica reportada en otros estudios (Kooy y col., 1994; Mehta y Dawson 2001; Kim y col., 2002; Park y col., 2004; Haddad, 1994; Lomonosova, 1998; Fernandes, 2005; Abreu, 2006).

e. Ensayo: Antes de iniciar el ensayo se colocaron en hielo y protegidos de la luz la solución de trabajo de DHR 123 (50 μM) y una alícuota de ONOO^- 50 mM. Se realiza el ensayo en un volumen final de 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, consistiendo la mezcla de reacción en: DPTA 100 μM , DHR 123 5 μM y muestras en diferentes concentraciones o bien, agua para el tubo de referencia (100% de oxidación o 0 mM). La oxidación de la DHR se inicia al agregar el ONOO^- (25 μM en el ensayo), esta reacción produce un color amarillo verde característico en el tubo de referencia, por lo que se registró la densidad óptica a 500 nm. Las lecturas de los tubos con muestras se compararon con los tubos de referencia los cuales fueron considerados como 0% de atrapamiento. El NDGA y la DL-penicilamina fueron usados como compuestos de referencia, puesto que ya se ha reportado que son atrapadores de ONOO^- (Floriano-Sánchez y col., 2006).

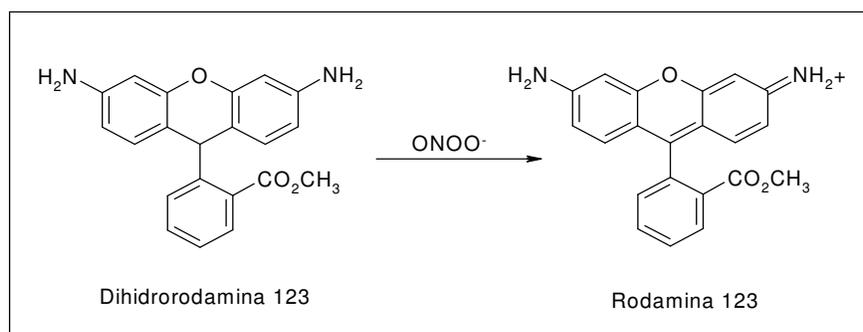


Fig. 8. Estructura y reacción de oxidación de la DHR 123

B. Estudio *in vivo*:

1. Diseño experimental.

1.1. Grupos. Las ratas se dividieron en 3 grupos: 1) Control quirúrgico (CQ), las cuales se sometieron al evento quirúrgico, esto es se les hizo nefrectomía derecha y se manipuló el pedículo renal izquierdo, pero sin inducir isquemia. 2) Isquemia/Reperusión (IR), a las cuales se les realizó nefrectomía derecha con isquemia izquierda de 40 min. También se les administró agua vía intraperitoneal según el mismo esquema de administración de SAC. 3) Isquemia/Reperusión + SAC (IR+SAC), a las cuales se les realizó nefrectomía derecha con isquemia izquierda de 40 min y se les administró el esquema indicado de SAC. En todos los grupos las ratas se sacrificaron a las 6 horas después de inducir la isquemia (tiempo de reperusión).

1.2. Modelo de isquemia/reperusión (I40R6). Se realizó un modelo de isquemia unilateral que consistió en que durante el mismo evento quirúrgico se realizaron la nefrectomía derecha y el pinzamiento del pedículo renal izquierdo para inducir isquemia. Previa anestesia intraperitoneal con pentobarbital a dosis de 50 mg/Kg preparada en dilución 1:2 con solución salina, se les realizó una incisión en la línea media abdominal para abordar la cavidad peritoneal, a continuación se realizó la nefrectomía derecha ligando primero el pedículo y, 15 min después, se pinzaron con un clip hemostático la arteria y vena renal izquierdas durante 40 min, al finalizar este periodo, se retira la pinza, y se cierran el peritoneo y la pared abdominal suturando en un solo plano con seda 3-0. Las ratas del grupo CQ fueron aquéllas en que sólo se realizó nefrectomía derecha sin isquemia izquierda. Finalmente, las ratas de los tres grupos se degollaron a las 6 horas después de la isquemia exponiéndolas previamente a CO₂.

1.3. Esquema/dosis de SAC: se administraron 4 dosis de 100 mg/Kg/vía intraperitoneal durante la cirugía (15 min antes de la nefrectomía, 15 min antes de la isquemia, inmediatamente antes de la reperusión y 2 horas después de la reperusión).

2. Obtención de muestras.

Se extrajo el riñón izquierdo, el cual se pesó y se cortó en rebanadas transversales delgadas (~2 mm), una se fijó en formalina 10% para estudio histológico y el resto se colocaron en papel aluminio, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -80°C para posteriores determinaciones. La sangre obtenida al momento de degollar las ratas se recolectó en tubos de vidrio.

3. Tratamiento de muestras.

3.1. Suero: la sangre recolectada se dejó coagular (~ 30 min) y, posteriormente, se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se separó el suero en alícuotas de ~ 300 µL que se almacenaron a -80°C.

3.2. Homogenados renales para determinación de actividad enzimática: se prepararon a partir de una dilución 1:10 (p/v) del tejido (cortes transversales congelados) en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 con tritón X-100 al 0.1%, la cual se homogenizó con un politrón durante ~15 seg, posteriormente, este homogenado se centrifugó a 15,300 rpm durante 1 h a 4°C y se separó el sobrenadante, el cual se almacenó en congelación a -80°C en 3 alícuotas de ~300 µL, hasta su uso para la determinación de actividad de catalasa, SOD o GPX. Se midió el contenido de proteínas en el homogenado por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

3.3. Homogenados renales para determinación de proteínas oxidadas: también se hizo una dilución del tejido 1:10 (p/v) pero en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 que además de tritón al 0.1% contenía inhibidores de proteasas (leupeptina 5 µg/mL, pepstatina 7 µL/mL y aprotinina 5 µg/mL), se homogenizó con el politrón durante ~15 seg y se centrifugó a 20,937 x g a 4°C por 20 min. Se tomaron 300 µL del sobrenadante y se incubaron con 100 µL de sulfato de estreptomina al 10%, a 4°C, durante toda la noche anterior a la determinación.

3.4. Cortes histológicos: las rebanadas fijadas en formalina 10% se deshidrataron gradualmente con lavados de etanol absoluto seguido de lavados de xilol y de parafina, enseguida se colocaron en moldes para su inclusión en parafina fundida a 60°C. Posteriormente, se retiraron del molde y con un microtomo se realizaron cortes de 3 µm de grosor, los cuales fueron colocados en portaobjetos

silanzados dejándolos en incubación por 15 min a 60°C. Estos cortes se utilizaron para realizar inmunohistoquímica o tinción de PAS.

4. Determinaciones:

4.1 Evaluación de la insuficiencia renal.

4.1.1 Marcadores bioquímicos

4.1.1.1 Nitrógeno de Urea en sangre (BUN).

Se utilizó un estuche comercial basado en la reacción descrita por Jung y col. (1975) y aplicando un método colorimétrico. Consiste en la reacción de la urea con el ortoftaldehído (R1) a 37°C en medio ácido (ácido bórico: R2) de la cual se obtiene un compuesto colorido que absorbe a 510 nm. La concentración de urea en el suero se obtiene al dividir la densidad óptica obtenida de cada una de las muestras entre la densidad óptica del estándar y el resultado se multiplica por 50 mg/mL (concentración del estándar) obteniendo así la concentración de urea. Después se divide entre 2.14, factor obtenido de dividir el peso molecular de la urea (60) entre 14 que es el peso molecular del nitrógeno y el resultado entre 2, que nos indica el número de átomos de nitrógeno por molécula de urea, obteniendo así la concentración de nitrógeno de urea en sangre, la cual se expresó en mg/dL. El procedimiento y ensayo se muestran en la Fig. 9.

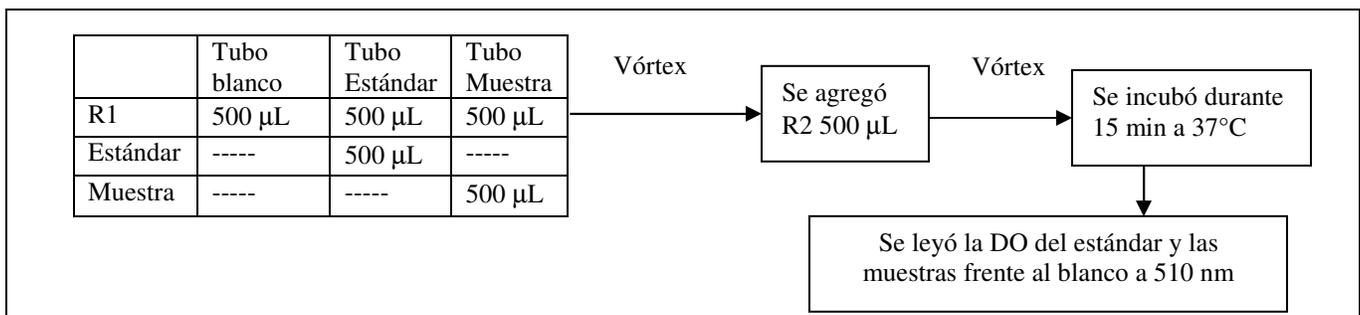


Fig. 9. Procedimiento y ensayo para la determinación de BUN.

4.1.1.2 Creatinina sérica.

Se utilizó un estuche comercial, basado en la reacción de Jaffé (Slot, 1965; Hare, 1950), que consiste en la reacción de la creatinina en un medio alcalino con el ácido pícrico para formar un complejo colorido – creatinina picrato- el cual absorbe a 492 nm. Para leerlo y determinar la concentración de creatinina presente se utilizó un autoanalizador.

4.1.2 Evaluación del daño estructural (tinción de PAS).

Las rebanadas de riñón procesadas como se mencionó previamente, se tiñeron con el ácido periódico de Schiff (PAS) para evidenciar polisacáridos, mucopolisacáridos neutros y glucoproteínas de las membranas del epitelio tubular. Para ello el tejido, se incubó con el ácido periódico durante 5 min y se lavó con agua destilada. Posteriormente, se incubó con el reactivo de Schiff durante 15 min y, finalmente, para contrateñir se utilizó hematoxilina por 30 segundos. Se realizó el análisis histológico utilizando el programa KS-300 (Carl Zeiss, Jena, Germany) en el cual se identifican y señalan las áreas tubulares con alteraciones histopatológicas como tumefacción, vacuolización citoplásmicas, descamación o necrosis, de un campo seleccionado al azar, con ello, el equipo calcula el total de estas áreas (área tubular dañada) en μ^2 , lo que se resta al área total del campo (μ^2). Los resultados se expresaron como porcentaje de daño túbulo-intersticial. Se seleccionaron 5 campos al azar (aumento de 100x) por muestra.

4.2 Evaluación del estrés oxidativo.

4.2.1 Contenido de carbonilo en proteínas (proteínas oxidadas).

Uno de los efectos de las ERO sobre las proteínas es la oxidación de residuos de aminoácidos generando grupos carbonilo (Stadtman y Levine, 2003), por lo que se empleó un método colorimétrico basado en la reactividad de esos grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), lo que forma un complejo colorido proteína-hidrazona que absorbe a 370 nm. Para la determinación se utilizó el sobrenadante obtenido como se describió previamente, y después de haberlo incubado con sulfato de estreptomicina (con una concentración final de 2.5%) durante toda la noche (para eliminar ácidos nucleicos) se realizó en tubos eppendorff (donde un tubo “muestra” es el que contiene DNPH/HCl y el tubo testigo o blanco contiene sólo HCl) el procedimiento mostrado en la Fig. 10, el cual consistió en

adicionar diferentes concentraciones de TCA seguidas de centrifugación para precipitar las proteínas y después hacer lavados con etanol-acetato de etilo para remover la DNPH libre y los lípidos contaminantes, finalmente, se resuspende el botón proteico en 1 mL de guanidina-HCl, se incuba y se centrifuga para leer en el espectrofotómetro a 370 nm las muestras que contienen el complejo proteína-hidrazona frente a cada uno de sus blancos (se calibra con guanidina-HCl 6.0 M). Posteriormente, se leen a 280 nm una curva estándar de albúmina sérica bovina (de 0.25 a 2 mg/mL) y los tubos blanco para determinar la cantidad de proteína en el ensayo. Para calcular el contenido de carbonilos se utilizó el coeficiente de absorción de la DNPH ($22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y los resultados se expresaron como nmoles de carbonilos/mg de proteína.

4.2.2 Inmunohistoquímica de 4-HNE.

Uno de los fenómenos que pueden ocurrir durante el estrés oxidativo es el daño ocasionado a las membranas celulares inducido por la lipoperoxidación, proceso que consta de tres fases y es principalmente en la segunda fase (de propagación) en la que se generan productos como radicales libres, peróxidos y aldehídos; considerados a su vez también citotóxicos, ya que son capaces de reaccionar con otros componentes celulares como proteínas y ADN. Por ello, uno de los métodos para evaluar el estrés oxidativo es detectando alguno de estos productos de lipoperoxidación. El 4-HNE (un aldehído) es considerado como uno de los principales productos finales de lipoperoxidación y uno de los principales generadores de estrés oxidativo, por lo tanto, es ampliamente utilizado como marcador de estrés oxidativo. Para su identificación se han desarrollado métodos directos o indirectos, de los cuales uno de los más utilizados es el de inmunohistoquímica para el que se requieren anticuerpos anti-4-HNE asociados a una enzima que forma un compuesto colorido. El compuesto colorido formado es insoluble y se precipita en el sitio donde se unió el anticuerpo así, estos depósitos pueden ser observados directamente por microscopía de luz, aunque también, es posible utilizar adicionalmente otros métodos de tinción para el resto del tejido (revisado en Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2005; Zarkovic y col, 2001; Zarkovic, 2003; Janeway, Charles A, 2001; página www.vectorlabs.com). Bajo estos principios, los cortes de riñón completo (3 μm) desparafinados se sometieron al siguiente procedimiento: primero se calentaron en Declare para dejar expuestos los sitios antigénicos y se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con 0.03% de H_2O_2 en metanol absoluto. Después, los cortes se

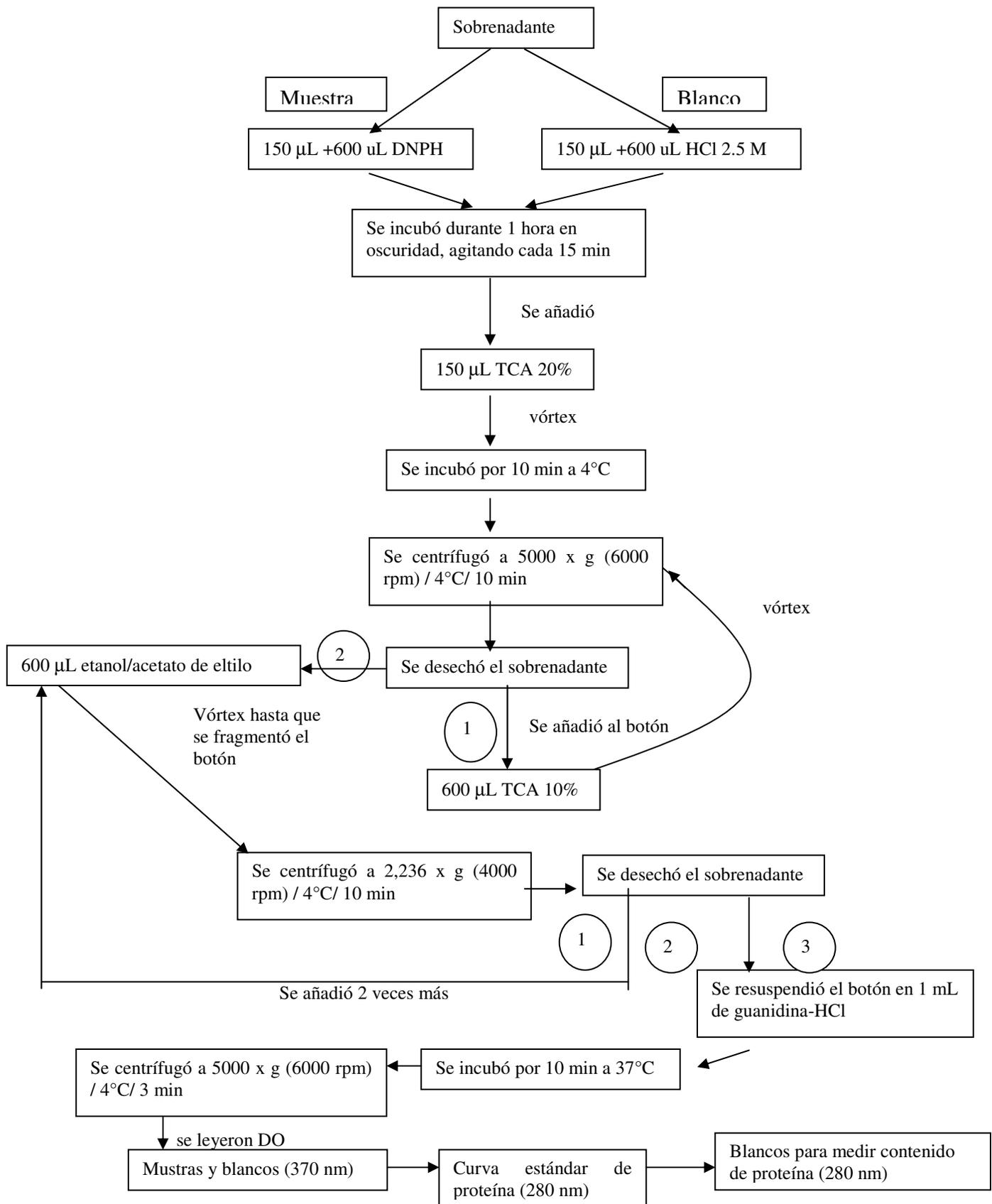


Fig. 10. Procedimiento y ensayo para la determinación de proteínas oxidadas.

incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti 3-HNE diluido 1:200 en amortiguador de fosfatos salino (PBS). A continuación, se realizaron varios lavados con PBS para remover el anticuerpo primario no unido y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG biotinilado diluido 1:500. Posteriormente, los anticuerpos fijados se detectaron utilizando un estuche comercial (Vectastain-ABC) que emplea un complejo preformado avidina-peroxidasa biotinilada y diaminobenzidina como sustrato (Fig. 11). Finalmente, después de lavar con PBS, los cortes se tiñeron con hematoxilina para contrastar el tejido y se montaron para su análisis en microscopía de luz. Se realizó un análisis morfométrico automático con un analizador de imagen computarizado KS-300 3.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) con el cual se detectó el porcentaje de células positivas (color café) por campo. Se estudiaron 5 campos por riñón seleccionados al azar, con un aumento de 100x para comparar los diferentes grupos. Para el control negativo, se usó el suero de cabra en lugar de los anticuerpos primarios.

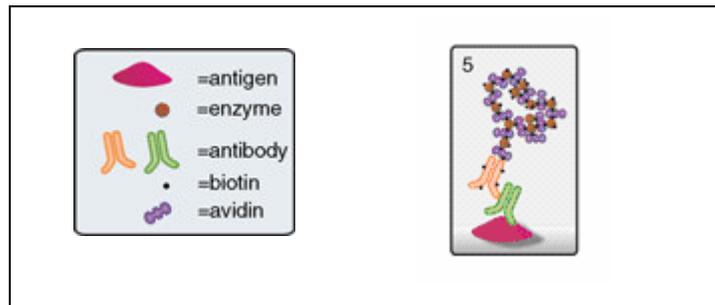


Fig. 11. Fundamento de la inmunohistoquímica. Método ABC: Complejo preformado de avidina-enzima biotinilada (tomado de vectorlabs.com).

4.2.3 Inmunohistoquímica de nitrotirosina (3-NT).

Puesto que ya se ha demostrado la participación del ONOO^- en este modelo renal (Noiri y col., 2001) se midió entonces el contenido de 3-NT como un marcador de la presencia de ONOO^- . El fundamento es que el ONOO^- puede reaccionar ya sea directa o indirectamente con diversos aminoácidos, entre ellos la tirosina, con la cual es convertido a 3-NT (revisado en Chirino y col. 2006; Alvarez y Radi, 2003; Stadtman y Levine, 2003). Para identificarla se utilizó la técnica de inmunohistoquímica donde a partir de los cortes de riñón completo (3 μm) desparafinados se realizó el mismo procedimiento descrito para la inmunohistoquímica de 4-HNE solo que la dilución del anticuerpo primario fue de 1:70. Para el análisis, también se utilizó el mismo equipo para detectar el porcentaje de células

positivas (color café) por campo. Igualmente, se estudiaron 5 campos seleccionados al azar por riñón, con un aumento de 100x.

4.3 Evaluación del sistema antioxidante.

4.3.1 Actividad de catalasa (CAT).

Su determinación se basó en la técnica descrita por Aebi (1984) que consiste en medir la desaparición del H₂O₂ a 240 nm debido a su descomposición por la presencia de catalasa en el tejido estudiado, para ello se registró el cambio de absorbencia, leyendo durante 30 segundos, que es el periodo en el que la descomposición del H₂O₂ sigue una cinética de primer orden. Por lo que se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida con la siguiente fórmula: $k=(1/t)(2.3 \times \log [A_1/A_2])$, donde t= intervalo de tiempo medido, A₁ y A₂ = absorbencias del H₂O₂ medidas en tiempos t₁ y t₂. El resultado se expresó como k/mg proteína, y el ensayo consistió en agregar 25 µL del homogenado renal (1:10 p/v), diluido 1:30 en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0, a 725 µL de H₂O₂ 30 mM (preparado en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0), agitar y vaciar en una celda de cuarzo para leer las DO en un programa de cinética: inmediatamente (t₀) y a los 15 y 30 seg (t₁ y t₂). El contenido de proteína en las muestras (homogenados) se determinó por el método de Lowry. Finalmente, la actividad específica se calcula al dividir el valor de k entre los mg de proteína presentes en el ensayo (~7-10 µg/ml), expresándose como k/mg de proteína.

4.3.2 Actividad de la superóxido dismutasa total (SOD).

El ensayo se basa en lo descrito por Oberley y Spitz (1984) que consiste en medir la reducción del NBT a formazán y cuyo fundamento es que se utiliza el sistema xantina-xantina oxidasa para generar anión superóxido, el cual al reaccionar con el NBT ocasiona su reducción a formazán que absorbe a 560 nm. Así, la SOD presente en la muestra a estudiar dismutará el anión superóxido generado en el sistema impidiendo así que reaccione con el NBT resultando en una menor formación de formazán. Por lo tanto, se mide la actividad de la SOD presente en el tejido como la inhibición de la formación de formazán, donde una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT. El procedimiento fue el siguiente:

Primero, se preparó una mezcla de reacción con una concentración final de los siguientes reactivos: xantina 0.3 mM, EDTA 0.6 mM, NBT 150 μ M, Na_2CO_3 400 mM y albúmina 0.1%. En seguida, se preparó una solución de xantina oxidasa 168 U/L en sulfato de amonio, la cual se mantuvo en hielo durante el ensayo. A continuación, se hicieron 2 pruebas para establecer las condiciones del ensayo en que la reducción del NBT fuera lineal con concentraciones crecientes de xantina oxidasa, así mismo que también hubiera una relación proporcional entre la disminución en la reducción del NBT (menor DO) y la mayor presencia de SOD en la muestra, para ello, primero se verificó que el sistema generador de anión superóxido funcionara estableciendo así la cantidad de xantina oxidasa a utilizar y después se estableció la dilución adecuada de la muestra (en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0). Posteriormente, el ensayo se realizó de la siguiente manera: en tubos de vidrio que se mantuvieron en incubación a 27°C, se agregaron sucesivamente 830 μ L de mezcla de reacción, 165 μ L de amortiguador en el caso del tubo 100% de reducción de NBT o de muestra (homogenado diluido 1:100) para los tubos blanco y tubos problema, xantina oxidasa a los tubos 100% y tubo problema o agua al tubo blanco y, finalmente, al terminar el tiempo de incubación de 15 min (contado a partir de que se añadió la xantina oxidasa) se añadieron 165 μ L de CuCl_2 para detener la reacción. Después, se leyeron las DO a 560 nm. Los resultados se expresan como U/mg proteína.

4.3.3 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPX).

Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976) que se basa en determinar la actividad de GPX de la muestra de forma indirecta al acoplarla con la reacción de la glutatión reductasa, midiendo la disminución de NADPH a 340 nm, ya que cuando la GPX descompone el peróxido de hidrógeno, el GSH es convertido a GSSG por lo que la glutatión reductasa consume NADPH para reducir de nuevo el GSSG. Para ello, se realizó el siguiente procedimiento: se preparó una mezcla de reacción (la cual se mantuvo en hielo durante el ensayo) que contenía EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM, glutatión reductasa 1 U/mL y amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0. En seguida se realizó el ensayo en tubos de vidrio, donde sucesivamente se agregaron 400 μ L de la mezcla de reacción; 50 μ L de amortiguador para el tubo inespecífico o 50 μ L de muestra (homogenado renal preparado 1:10 p/v y diluido 1:8 en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0), para tener así una cantidad de proteína en el ensayo de ~100-160 μ g/mL; se agitó y después de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 50 μ L de H_2O_2 2.5 mM e, inmediatamente, se vació a una celda de cuarzo para leer las DO a 340 nm cada minuto durante 3 min. El ensayo se hizo por triplicado y los

resultados se expresaron como U/mg de proteína, donde una unidad se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto.

5. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando las pruebas estadísticas del programa Prism 3.0 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Se realizó la transformación logarítmica de los datos en los casos en que las varianzas resultaron diferentes con el análisis de Bartlett (Bartlett positivo), esto se aplicó para comparar SAC vs polvo de ajo y SAC vs ajo crudo y, a esos datos transformados, se les aplicó un ANOVA seguido del análisis de comparación múltiple de Bonferroni. Para los demás casos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de pruebas de comparaciones múltiples: Bonferroni (para BUN, creatinina, proteínas oxidadas, enzimas antioxidantes e inmunohistoquímica). En el caso del análisis histológico se aplicó la prueba de Mann Whitney. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando hubo un valor de p menor a 0.05.

VI. RESULTADOS

A. ESTUDIO *in vitro*

a. Capacidad atrapadora de peroxinitrito (concentración inhibitoria media: CI_{50}). Se evaluó mediante el ensayo con DHR 123. Se observó que la SAC atrapa efectivamente $ONOO^-$ de manera dependiente de la concentración (Fig. 12) ya que atrapó de manera significativa (contra tubo 0 mM) a las siguientes concentraciones: 0.4, 0.7, 1 y 2 mM. A la concentración de 2 mM se observó un atrapamiento que va de 74% a 92%. Con un valor de $CI_{50} = 0.803 \pm 0.040$ mM = 134 ± 9 μ g/mL (Tabla 4.).

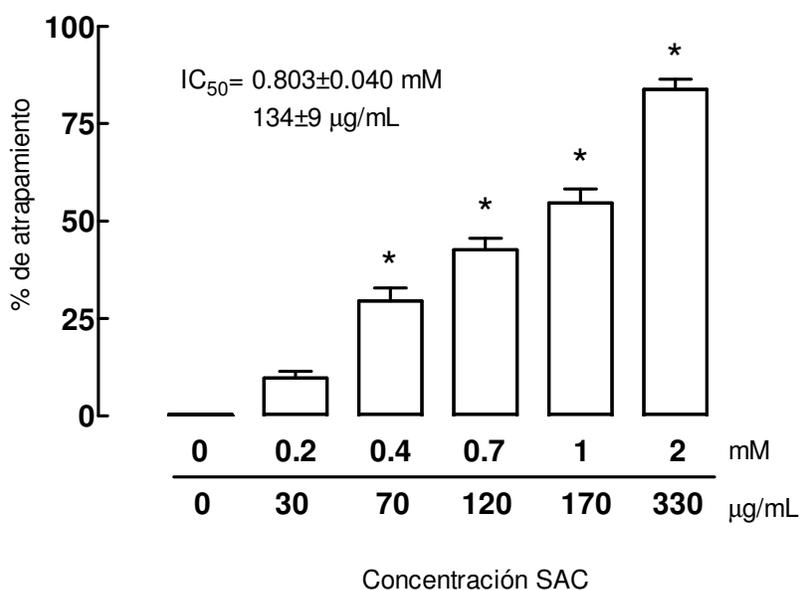


Fig. 12. Actividad atrapadora de $ONOO^-$ de la SAC.

Barras son promedio \pm EE. n=10. * $p < 0.001$ vs 0 mM.

b. Capacidad atrapadora de la SAC comparada con extractos de ajo y compuestos de referencia

Como compuestos de referencia se utilizaron la pencilamina y el NDGA, ya que son compuestos conocidos como eficaces atrapadores de peroxinitrito. Ambos mostraron también un comportamiento dependiente de la concentración encontrándose que la actividad atrapadora del NDGA fue significativa

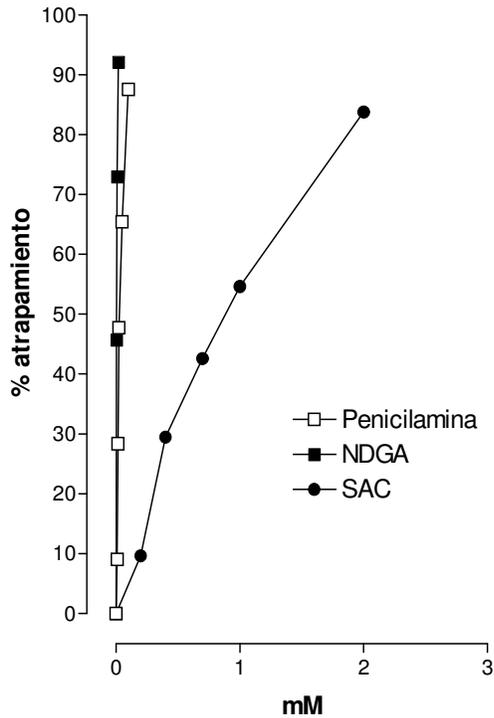
en el rango de concentración de 1 a 6 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la de penicilamina lo fue desde 2.5 a 15 $\mu\text{g/mL}$. Cabe mencionar que el DMSO (vehículo) no interfirió con el ensayo. Al comparar las CI_{50} de NDGA ($1.18\pm 0.15 \mu\text{g/mL}$), penicilamina ($4.6\pm 0.3 \mu\text{g/mL}$) y SAC ($134\pm 9 \mu\text{g/mL}$) se encontró que el NDGA atrapó ONOO^- más efectivamente que la penicilamina y ambos son mejores atrapadores que la SAC, ya que la diferencia entre las CI_{50} de los compuestos de referencia y la de la SAC es de ~ 200 veces respecto al NDGA y ~ 20 veces respecto a la penicilamina (Fig.13. Panel A; Tabla. 4). Por otra parte, también se tomaron como referencia dos extractos acuosos del ajo (de polvo y de ajo crudo), cuyos porcentajes de atrapamiento también mostraron un comportamiento dependiente de la concentración (Fig. 13. Panel B). La capacidad atrapadora de ONOO^- del ajo crudo fue significativa en el rango de 0.05 a 4 mg/mL , mientras que la del polvo se presentó entre 0.1 a 2 mg/mL . Al comparar las CI_{50} del extracto del polvo, extracto del ajo crudo y la SAC se encontró que el extracto del polvo es mejor que el extracto de ajo crudo y que la SAC es mejor atrapador que ambos. Entonces, dados los antecedentes de que la SAC también atrapa otras ERO involucradas en el daño renal inducido por IR, que ha demostrado protección en otro modelo de IR, y que es mejor atrapador de ONOO^- que el extracto de ajo acuoso, con el cual se ha visto protección frente al daño renal inducido por IR, se utilizó en el modelo *in vivo* de IR renal.

Tabla 4. Capacidad atrapadora de la SAC, el ajo y compuestos de referencia sobre el ONOO^- (valores de CI_{50}).

	Compuesto/Ajo	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} (mM)
	SAC	134 ± 9^a (10)	0.803 ± 0.040 (10)
Extractos acuosos de ajo	Extracto de polvo	300 ± 20^b (12)	
	Extracto de ajo crudo	840 ± 80^c (14)	
Compuestos de referencia	NDGA	1.18 ± 0.15 (11)	0.0039 ± 0.0005 (11)
	Penicilamina	4.60 ± 0.30^d (8)	0.0306 ± 0.002 (8)

Datos son promedio \pm EE. Datos entre paréntesis indican el número de ensayos independientes. ^{a, b, c} indican diferencias significativas, $p < 0.001$. ^d $p < 0.0001$ vs NDGA.

A.



B.

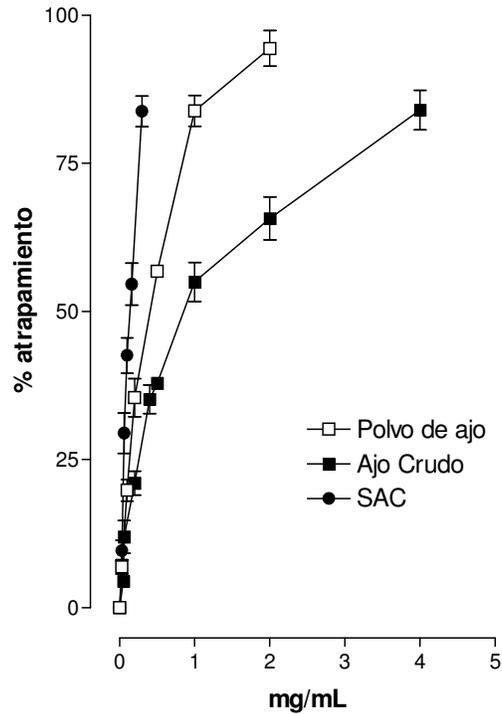


Fig. 13. Capacidad atrapadora de ONOO^- A. SAC y compuestos de referencia (NDGA y penicilamina) B. SAC y extractos acuosos de ajo (extracto de polvo de ajo y extracto de ajo crudo). Datos son promedio \pm EE. n=8-13.

ESTUDIO *in vivo*

Modelo de IR: Isquemia unilateral de 40 min con nefrectomía derecha y reperusión de 6 horas.

SAC: dosis total de 400 mg/Kg/día de la cirugía.

1. Evaluación de la insuficiencia renal. Para evaluar el daño funcional se utilizaron marcadores bioquímicos (determinaciones séricas de BUN y creatinina), mientras que para el daño estructural se realizó análisis histológico con tinción de PAS.

1.1 Marcadores bioquímicos

Se observó que en el grupo sometido a IR hubo un aumento significativo de BUN (49.00 ± 0.90 mg/dL) de ~1.7 veces respecto al control quirúrgico (27.80 ± 0.99 mg/dL) mientras que en el grupo tratado con SAC se observó un incremento de ~1.3 veces (39.59 ± 1.58 mg/dL), encontrando que hubo diferencia significativa entre el grupo IR y el grupo de IR tratado con SAC. Entonces se previno parcialmente el incremento de BUN en el grupo tratado con SAC. Al evaluar creatinina en suero se observó que aumentó también en el grupo IR (2.07 ± 0.06 mg/dL) ~2 veces, mientras que en el grupo tratado con SAC se previno este incremento (1.80 ± 0.11 mg/dL), aunque tampoco iguala a los valores del control (0.53 ± 0.02 mg/dL). Estos resultados demuestran que la insuficiencia renal se presentó en los grupos con IR no así en los grupos control, mientras que se atenuó en los grupos tratados con SAC. Por lo tanto, se observa un efecto protector parcial de 20% con BUN y 14% con creatinina (Fig. 14).

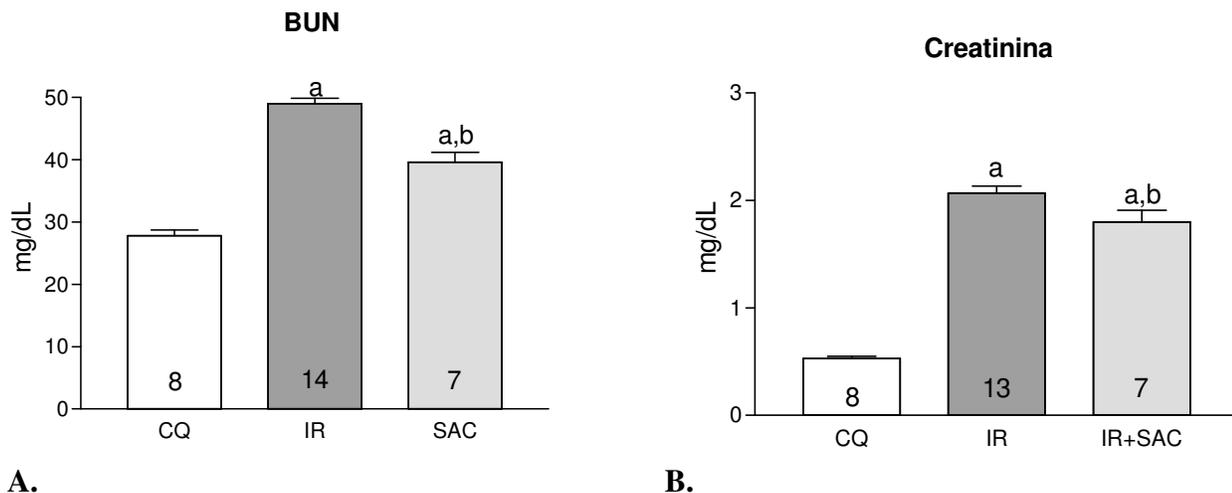


Fig. 14. Parámetros de función renal. Datos son promedio \pm EE, n se indica en barras.

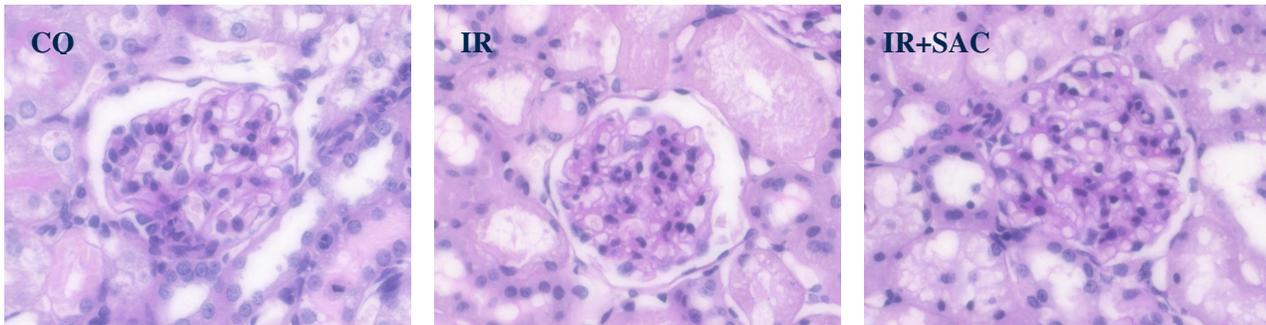
A. BUN: a, $p < 0.001$ vs CQ; b, $p < 0.001$ vs IR. B. Creatinina: a, $p < 0.001$ vs CQ; b, $p < 0.05$ vs IR.

CQ: control quirúrgico; IR: isquemia-reperfusión; IR+SAC: IR tratado con SAC.

1.2 Análisis histológico

El daño histológico (daño tubular) se evaluó en corteza, mediante la determinación del porcentaje de área túbulo intersticial dañada (vacuolización, necrosis, descamación, tumefacción) por campo. Se observó un menor daño estructural, de ~40% en el grupo de IR tratado con SAC en comparación con 50% de área dañada en el grupo de IR sin tratamiento (Fig. 15). Por lo tanto la SAC ejerció un efecto protector parcial sobre el daño estructural de un ~10%. Se muestran fotografías representativas a 400x.

A.



B.

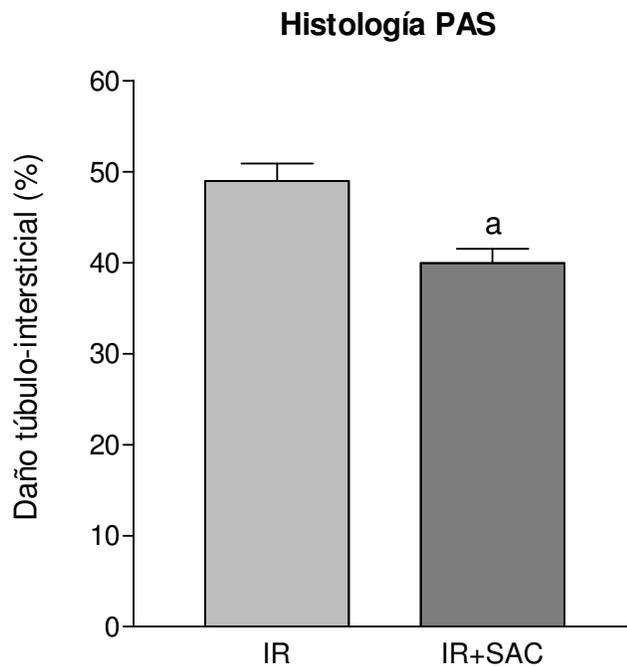


Fig. 15. Evaluación de daño tubular con tinción de PAS. A. Fotos representativas de histología teñidas con PAS. B. Gráfica de cuantificación del porcentaje de área tubular dañada. Datos son promedio \pm EE, $n=5$. a, $p < 0.05$ vs IR. CQ: control quirúrgico; IR: isquemia-reperfusión; IR+SAC: IR tratado con SAC.

2. Marcadores de estrés oxidativo en tejido renal. Se midieron tres marcadores con el fin de evaluar el estrés oxidativo y nitrosativo ocasionado por IR en el riñón y, para determinar si la SAC ejercía un efecto a este nivel. Se eligió medir la concentración de proteínas oxidadas por un método espectrofotométrico y la lipoperoxidación a través de inmunohistoquímica de 4-HNE. También, se midió el contenido renal de 3-NT por inmunohistoquímica como marcador de la participación del ONOO^- .

2.1 Contenido de grupos carbonilo en las proteínas (proteínas oxidadas)

Se determinó el contenido de grupos carbonilo en las proteínas, esto es la concentración de proteínas oxidadas (Fig. 16) encontrando que en el grupo IR hay un incremento significativo (2.53 ± 0.16 nmoles de DNPH/mg proteína) de casi tres veces respecto al grupo control (0.91 ± 0.06 nmoles de DNPH/mg proteína); sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre el grupo IR y el tratado con SAC (2.09 ± 0.56 nmoles de DNPH/mg proteína).

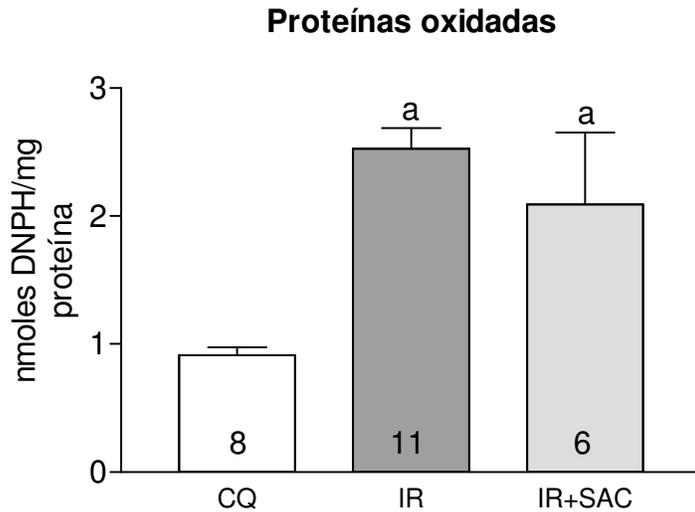


Fig. 16. Contenido de grupos carbonilo en proteínas. Datos son promedio \pm EE, n se indica en barras. a, $p < 0.001$ vs CQ. CQ: control quirúrgico; IR: isquemia/reperfusión; IR+SAC: IR tratado con SAC.

2.2 Contenido de 4-hidroxinonenal (4-HNE)

Otro marcador para evaluar el estrés oxidativo es a través de la detección de los productos de lipoperoxidación, entre ellos el 4-HNE. Por ello, se midió en tejido renal (corteza) la tinción de 4-HNE por inmunohistoquímica (Fig. 17) y se observó que hay una marcada tinción en el grupo IR lo que no se observa en el grupo control, mientras que, este incremento en la tinción se previno significativamente en el grupo tratado con SAC (la tinción disminuyó en un 50% respecto al grupo de IR).

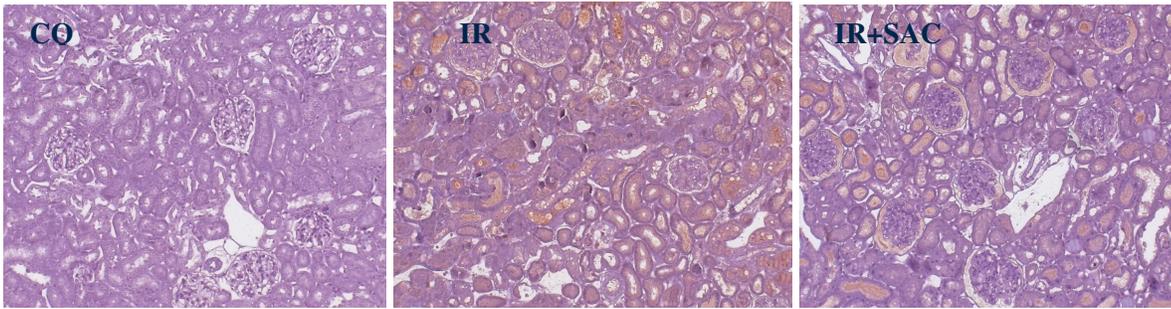
2.3 Contenido de nitrotirosina (3-NT)

Para determinar si la capacidad atrapadora de ONOO^- de la SAC observada *in vitro* era capaz de proteger por este mecanismo el daño ocasionado en el riñón sometido a IR se midió la nitración de proteínas, la cual se evaluó mediante la tinción de 3-NT por inmunohistoquímica, encontrando que hay mayor cantidad de 3-NT (20 veces más) en el grupo de IR respecto al control, sin embargo, no se encontró que el tratamiento con SAC previniera este incremento (Fig. 18).

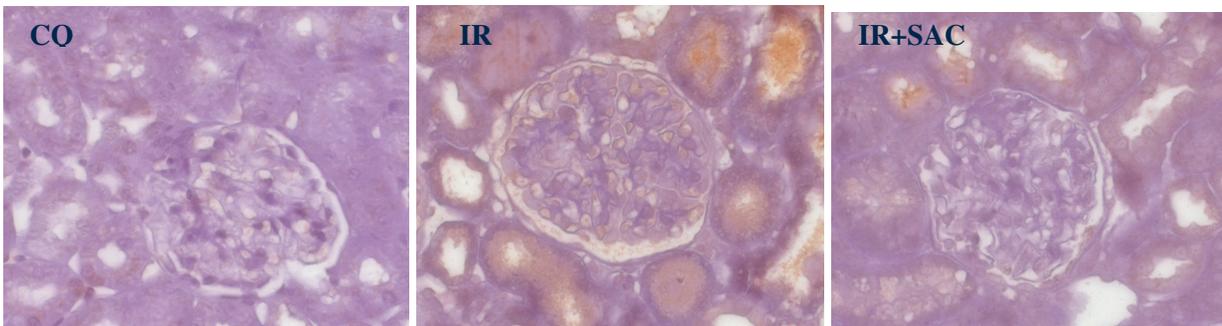
Por lo tanto, se concluye que sí hay estrés oxidativo por el marcado incremento en la concentración de proteínas oxidadas y contenido de 4-HNE en el grupo IR, así mismo, también se observó un incremento del estrés nitrosativo evaluado por el contenido de 3-NT y, la SAC modificó uno de estos parámetros de estrés oxidativo previniendo de forma parcial el incremento de la lipoperoxidación.

A.

100x



400x



4-Hidroxinonenal

B.

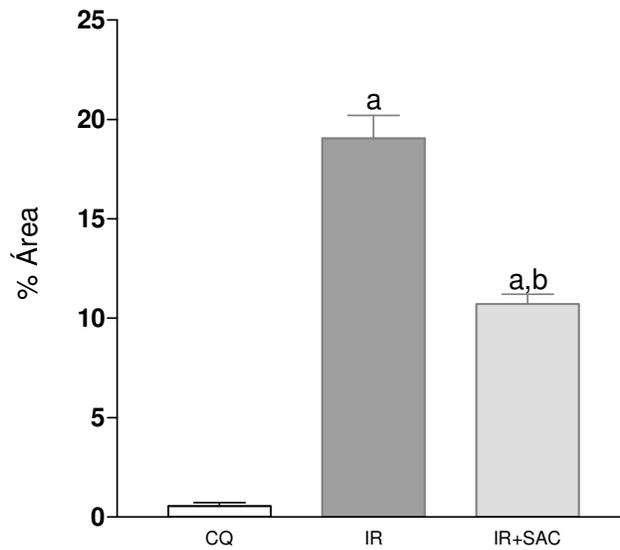
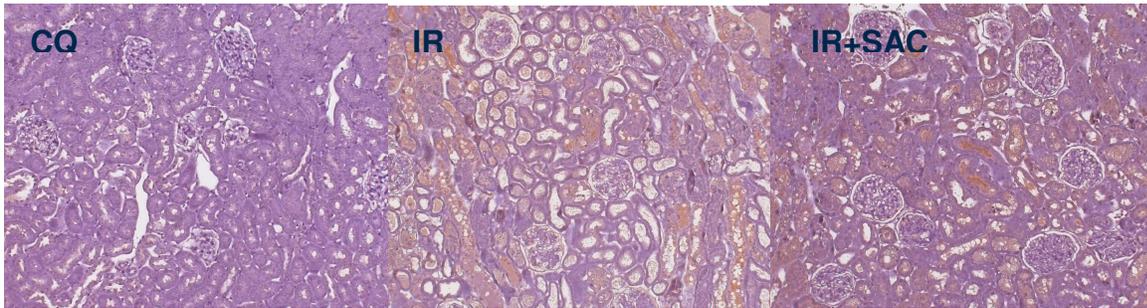


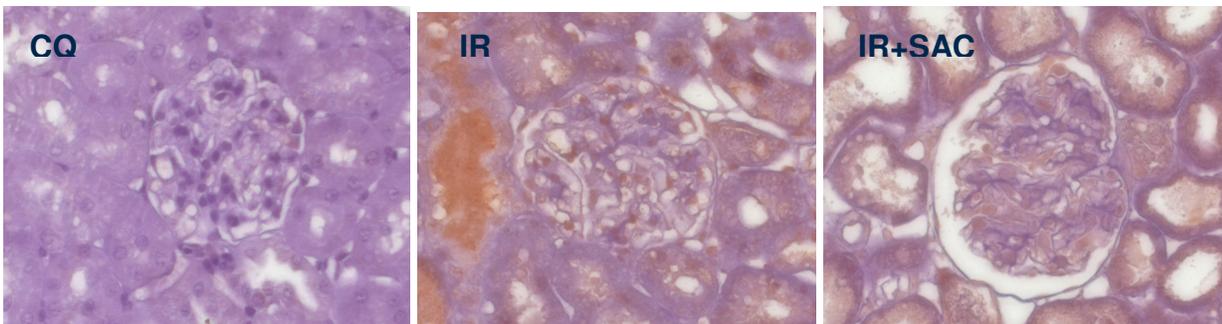
Fig. 17. Contenido de 4-HNE. A. Fotos representativas de inmunohistoquímica. B. Gráfica de cuantificación de nitrotirosina en riñón. Datos son promedio \pm EE, n= 5. a, $p < 0.001$ vs CQ; b, $p < 0.001$ vs IR. CQ: control quirúrgico; IR: isquemia-reperfusión; IR+SAC: IR tratado con SAC.

A.

100x



400x



B.

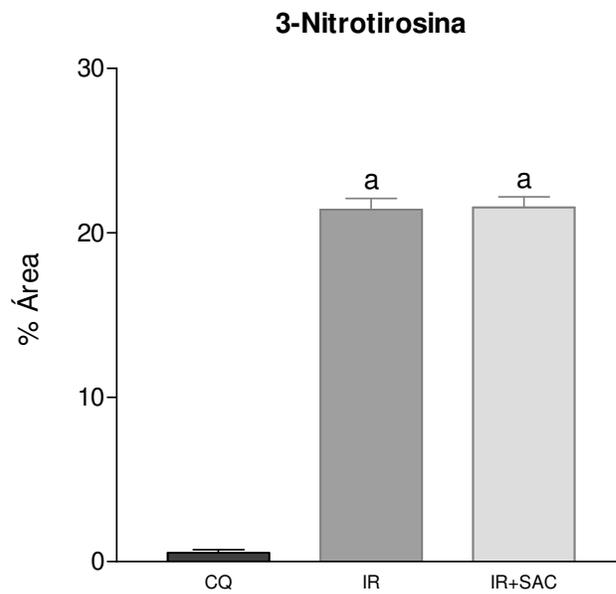


Fig. 18. Contenido de nitrotirosina. A. Fotos representativas de inmunohistoquímica. B. Gráfica de cuantificación de nitrotirosina en riñón. Datos son promedio \pm EE, $n=5$. a, $p < 0.001$ vs CQ. CQ: control quirúrgico; IR: isquemia/reperfusión; IR+SAC: IR tratado con SAC.

3. Evaluación del sistema antioxidante (actividad de las enzimas antioxidantes) en tejido renal. Se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes: GPX, CAT, SOD (Fig. 19) con el objetivo de evaluar si la SAC ejercía un efecto sobre el sistema antioxidante que apoyara la acción protectora encontrada *in vivo*. Se observó un claro decremento en la actividad de GPX y CAT (aproximadamente dos veces) en el grupo de IR (0.0342 ± 0.001 U/mg proteína y 0.205 ± 0.012 k/mg proteína respectivamente) respecto al control (0.058 ± 0.003 U/mg proteína y 0.492 ± 0.028 k/mg proteína respectivamente); sin embargo, el tratamiento con SAC no logró prevenir este efecto (GPX: 0.0338 ± 0.004 U/mg proteína y CAT: 0.203 ± 0.027 k/mg proteína). La disminución de la actividad de SOD en el grupo IR (36.00 ± 0.89 U/mg proteína) respecto al control (42.18 ± 2.64 U/mg proteína) fue menos evidente pero significativa. Sin embargo, tampoco se observa una recuperación con SAC (36.81 ± 1.25 U/mg proteína).

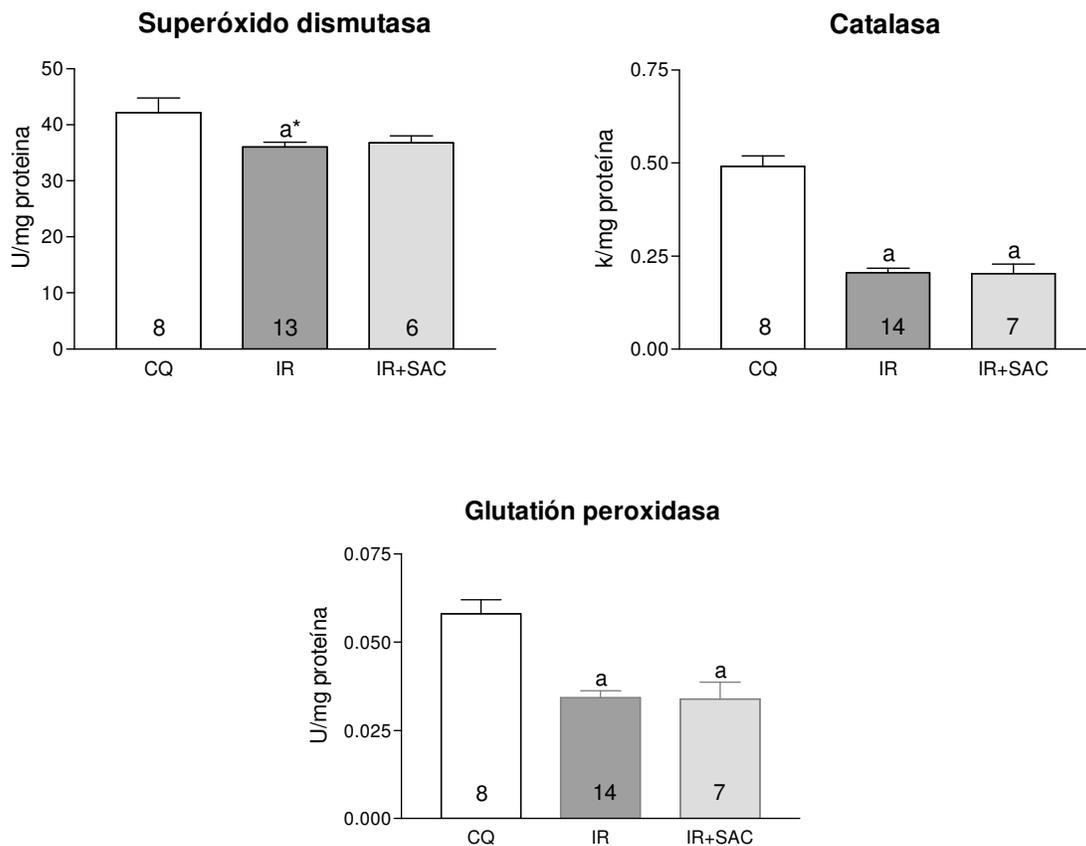


Fig. 19. Actividad de enzimas antioxidantes en riñón. Datos son promedio \pm EE, n se indica en barras. a* $p < 0.05$ vs CQ; a $p < 0.001$ vs CQ. CQ: control quirúrgico; IR: isquemia-reperfusión; IR+SAC: IR tratado con SAC.

VII. DISCUSIÓN

Se ha encontrado que el estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de diversas enfermedades tanto crónicas como agudas, por ejemplo Alzheimer, enfermedad vascular cerebral, aterosclerosis, entre otras (revisado en Chirino y col., 2006). Por otra parte uno de los tipos de lesión celular más frecuente en la práctica clínica es aquella ocasionada por isquemia (revisado en Cotran y col., 2000) que generalmente se acompaña también de un evento de reperfusión, donde se ha encontrado que existe un daño adicional asociado a la reperfusión aparte del de la isquemia misma, lo cual se ha asociado al estrés oxidativo y nitrosativo como factores importantes dentro de su patogenia (Jefayri y col., 2000; Dalsing y col., 1983; Ferrari y col., 1985; Baker y col., 1985; Kadkhodae y col., 1995; Vanden y col., 1997; Tan y col., 1995; Bhaskar y col., 1995; Noiri y col., 2001). Hay órganos que son más susceptibles a este tipo de lesión dado su abundante flujo sanguíneo, como el cerebro, corazón y riñón, en este último, por ejemplo, se ha encontrado que la lesión por isquemia se encuentra en cerca del 50% de los pacientes con insuficiencia renal aguda (Deng y col., 2001), por lo que se han desarrollado diversos modelos experimentales en estos órganos con la finalidad de conocer los mecanismos de daño y cómo prevenirlo. Así pues, el papel importante que juegan las ERO y ERN como mediadores de la progresión del daño tisular inducido por IR (Valdivielso y col., 2001) se apoya en el hecho de que se ha demostrado que el uso de antioxidantes disminuye la concentración de ERO (Kashimoto y col., 1999), y que provee protección contra el daño tisular en diversos órganos con IR como en el corazón, cerebro, intestino y riñón (Rietz y col., 1993; Besse y col., 2006; Onem y col., 2006; Yagmurdur y col., 2003; Baker, y col., 1985).

Las estrategias antioxidantes usadas son diversas, como la sobreexpresión de enzimas antioxidantes o la administración de antioxidantes exógenos, algunos de ellos derivados de plantas medicinales, ya sea compuestos puros o bien extractos. Los numerosos compuestos organosulfurados derivados del ajo en especial los sulfóxidos, tiosulfatos y polisulfuros así como diversos extractos de ajo, entre ellos el extracto de ajo envejecido (EAE), el cual posee un alto contenido de SAC, y el extracto de ajo acuoso han demostrado propiedades antioxidantes en diversos modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Higuchi y col., 2003; Ito y col., 2003a, b; Kosuge y col., 2003; La Cruz y col., 2006; Lin y col., 2004; Mostafá y col., 2000; Nakagawa y col., 1998; Pérez-Severiano y col., 2004a,b; Sundaresan y Subramanian, 2003; Medina-Campos y col., 2007; Peng y col., 2002; Ide y Lau, 1997; Ide y Lau, 2001; Ide y Lau, 1999; Numagami y col., 1996; Numagami y Ohnishi, 2001; Kabasakal y col., 2005; Kim y col., 2001).

Y aunque los compuestos del grupo de los sulfóxidos de cisteína se han estudiado ampliamente y han sido identificados como los principales responsables de los efectos farmacológicos del ajo, hasta hace 10 años el estudio de las γ -glutamilcisteínas y sus efectos no había sido bien establecido ya que había pocos estudios farmacológicos con ellas (revisado en Lawson, 1998). Así pues el estudio de las propiedades y los efectos de estos compuestos es relativamente reciente. Sobre la SAC ya se ha descrito su capacidad antioxidante para algunas ERO (Medina-Campos y col., 2007; Peng y col., 2002; Ide y Lau, 2001; Ide y Lau, 1999). Pero el primer propósito de este estudio fue caracterizar su capacidad atrapadora de peroxinitrito, porque se había descrito que el EAE y la misma SAC eran capaces de inhibir la hemólisis inducida por ONOO^- (Morihara y col., 2005) y el daño isquémico asociado a un aumento de ONOO^- en cerebro (Kim y col., 2006), sin embargo, las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) para ONOO^- no se habían cuantificado. Se partió de la hipótesis de que podría ser un atrapador efectivo de ONOO^- por el antecedente de estos estudios y por los reportes previos de su capacidad antioxidante sobre otras ERO (Medina-Campos y col., 2007). Por ello, se montó un ensayo para evaluar su capacidad atrapadora de ONOO^- , encontrando que lo atrapa con una CI_{50} de 0.80 mM que es 20 a 200 veces mayor que la de los compuestos de referencia usados. También, se observó que la SAC presentó un comportamiento dependiente de la concentración, al igual que los compuestos de referencia y los extractos de ajo, ya que se presentó un atrapamiento cercano al 100% con una concentración 2 mM. Al compararla con la capacidad atrapadora de los extractos de ajo se encuentra que su CI_{50} es menor que la del extracto de ajo crudo, y del polvo de ajo. De esta parte del trabajo se concluyó que la SAC atrapa ONOO^- de manera dependiente de la concentración, y aunque su efectividad es menor que los compuestos de referencia, es más efectiva que el polvo de ajo o el extracto de ajo acuoso.

Por lo tanto, tomando en cuenta que la SAC tiene las siguientes características (a) es capaz de atrapar ERO involucradas en el daño renal inducido por IR (Baker y col., 1985; Kadkhodae y col., 1995; Vanden y col., 1997; Tan y col., 1995; Bhaskar y col., 1995; Noiri y col., 2001; Medina-Campos y col., 2007), (b) en este proyecto se observó que la SAC es un atrapador del ONOO^- (especie también involucrada en el daño por IR), (c) disminuye la lipoperoxidación en sistemas *in vitro*, en sistemas celulares (Ide y Lau, 1997; Ide y Lau, 2001; Ide y Lau, 1999; Ho y col., 2001; Nishimura y col., 2004) y en otros modelos *in vivo* como por ejemplo, en el cerebro con isquemia y reperusión (Hsu y col., 2004; Numagami y col., 1996; Numagami y Ohnishi, 2001; Kim y col., 2006), y (d) y a que también se ha observado que puede intervenir en la regulación de la síntesis de óxido nítrico (Ippoushi y col., 2002; Kim y col., 2001), se utilizó entonces en el modelo *in vivo* de IR renal para evaluar si con esa

capacidad antioxidante era capaz de atenuar o prevenir el daño renal y el estrés oxidativo/nitrosativo inducido por isquemia/reperfusión.

Ahora bien, se han reportado y caracterizado en la literatura diversos modelos para estudiar el daño por IR, donde se ha encontrado que el estrés oxidativo, evaluado como lipoperoxidación (Seujang y col., 2006; Akcetin y col., 2000; Eschwege y col., 1999) se observa incluso con un periodo de isquemia de 15 min, siendo máximo con 30 min (Seujang y col., 2006); mientras que, durante la reperfusión se observa un pico máximo entre los 5 hasta 15 o 20 min (Akcetin y col., 2000; Grekas y col., 1996; Eschwege y col., 1999; Numagami y Onishi 2001; Numagami y col, 1996). Por ello, se eligió el modelo de isquemia unilateral con nefrectomía, induciendo daño con 40 min de isquemia y 6 horas de reperfusión, pues con ese lapso se encuentran lesiones renales características de IR. La dosis y esquema de administración se eligió basándose en: (1) su farmacocinética, ya que se ha observado que al administrarla en ratas, el riñón es el órgano en el que se encuentra la mayor concentración a los 15 min, la cual se mantiene aproximadamente por 1 hora (Yang y Zeng, 2005), (2) otros modelos que involucran al EO, donde se observó efecto protector de la SAC con dosis desde 200 hasta 300 mg/Kg en ratas (Sundaresan y Subramanian, 2003; Velmurugan y col., 2003; Maldonado y col., 2003; Numagami y Ohnishi, 2001; Numagami y col, 1996), (3) estudios donde se observó efecto protector de otros antioxidantes utilizando el esquema de 30 min antes de la isquemia e inmediatamente antes de la reperfusión en el mismo modelo de IR renal (Kabasakal y col., 2005; Sener y col., 2005), (4) ensayos previos probando otros esquemas y dosis.

Se propuso que dado la magnitud del daño que implica la IR fuera probable que se necesitara un esquema de tratamiento con dosis administradas en tiempos más cercanos a la isquemia para mantener concentraciones constantes en riñón, durante la isquemia y al momento de la reperfusión, en especial en los primeros minutos donde ocurre el nivel mas alto de lipoperoxidación, ya que con los esquemas reportados previamente en modelos de IR tratados con SAC, se atenúa la cantidad de ERO a los 20 min de reperfusión pero aún no se lograba disminuir el pico de los 5 min (Numagami y Onishi 2001; Numagami y col, 1996). Por eso se prefirió dar a tiempos más cercanos de la isquemia administrando una dosis total de 400 mg/Kg: 200 mg/Kg antes de la isquemia divididos en dos dosis de 100 mg/Kg, una 15 min antes de la nefrectomía (que corresponde a 30 min antes de la isquemia) y 15 min antes de la isquemia, para asegurar las máximas concentraciones posibles de SAC en el riñón al momento de inducir la isquemia. E igualmente dos dosis más después de la isquemia de 100 mg/Kg cada una:

inmediatamente antes de la reperfusión (buscando atenuar el pico de lipoperoxidación que ocurre en los primeros 5 a 15 min de reperfusión) y a las 2 hrs después de la reperfusión para mantener aún los niveles altos de SAC en riñón.

Con este protocolo se encontró que en el riñón sometido a IR hay una marcada pérdida de la función renal evidenciada como un aumento de 1.7 a 2 veces de los niveles séricos de BUN y creatinina, respectivamente, así como también daño estructural en los túbulos renales. Mientras que el daño oxidativo se hizo evidente como un aumento en la oxidación de proteínas, de la nitración de proteínas y de formación de aductos de 4-HNE. También, se observó una disminución en el sistema antioxidante enzimático (GPX, SOD y CAT). Con la administración previa y durante la cirugía de dosis repetidas de SAC se encontró que se atenúa el daño estructural y funcional renal pero no se modifican todos los parámetros de estrés oxidativo evaluados, ya que efectivamente disminuye la lipoperoxidación (disminución del área teñida por inmunohistoquímica de los aductos de 4-HNE) pero no disminuye el contenido de proteínas oxidadas medido con un método colorimétrico, ni tampoco ejerce algún efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.

Por otra parte, hay que considerar que la CI_{50} para $ONOO^-$ de compuestos atrapadores de referencia (penicilamina y NDGA) está en el rango micromolar mientras que la CI_{50} para SAC está en el rango milimolar, pero también que la SAC es un atrapador de OH^\bullet (Medina-Campos y col., 2007), ERO involucrada principalmente en el proceso de lipoperoxidación, y que se ha observado además que sus efectos antioxidantes *in vivo* dependen de la dosis usada (Numagami y Ohnishi 2001; Pérez-Severiano y col., 2004a; Kim y col., 2006).

De lo anterior, se puede sugerir que los resultados obtenidos *in vivo* se pueden deber en parte a este patrón de capacidad antioxidante, ya que al ser la SAC un atrapador de OH^\bullet , esto pudiera estar involucrado en disminuir el daño por lipoperoxidación ocurrido en los primeros min de la reperfusión, lo que se demuestra por la disminución en la tinción de 4-HNE por inmunohistoquímica, pero no tiene un potencial tan alto para atrapar $ONOO^-$ que evitara la nitración de proteínas. Sin embargo, también hay que considerar que la SAC pudiera ejercer su protección por medio de otros mecanismos descritos en modelos similares de enfermedad y que no se analizaron en este trabajo, como su efecto de inhibir la activación del NF-k B (Kim y col., 2001; Ide y Lau, 2001; Geng y col., 1997; o la apoptosis (Peng y col., 2002).

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

En el ensayo *in vitro* se encontró que la SAC tiene capacidad atrapadora de peroxinitrito, mostrando un efecto dependiente de la concentración ($CI_{50} = 0.803 \pm 0.040 \text{ mM} = 134 \pm 9 \text{ mg/mL}$).

En el estudio *in vivo*, la SAC presentó protección parcial frente al daño renal con una dosis de 400 mg/Kg dividida en 4 administraciones durante el evento quirúrgico (15 min antes de la nefrectomía, 15 min antes de la isquemia, inmediatamente antes de la reperfusión y 2 horas después de la reperfusión).

Con el esquema de administración y dosis de SAC empleada se observó un efecto protector parcial sobre la función renal y el estrés oxidativo (previene el aumento en la lipoperoxidación) inducido por IR. Pero, durante la IR hay un decremento en la actividad del sistema antioxidante enzimático y un aumento en la nitración de proteínas que no son modificados al administrar SAC.

IX. CONCLUSIONES

La SAC atrapa directamente al $ONOO^-$ *in vitro*. Sin embargo, los datos de nuestro trabajo señalan que, el papel protector parcial que se observó sobre la función renal y el estrés oxidativo pudiera estar más relacionado con su capacidad atrapadora de otras ERO reportadas previamente más que por su capacidad atrapadora de peroxinitrito.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu P, Matthew S, Gonzalez T, Costa D, Segundo MA, Fernandes E. 2006. Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. *Life Sci.* 78:1578-1585.

Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.

Akçetin Z, Busch A, Kessler G, Heynemann H, Holtz J, Bromme HJ. 1999. Evidence for only a moderate lipid peroxidation during ischemia-reperfusion of rat kidney due to its high antioxidative capacity. *Urol Res.* 27:280-284.

Akçetin Z, Pregla R, Busch A, Kessler G, Heynemann H, Holtz J, Bromme H. 2000. Lipid peroxidation and the expressional regulation of the heat-shock response during ischemia-reperfusion of rat kidney. *Urol Int.* 65:32-39.

Alvarez B, Radi R. 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids.* 25: 295-311.

Arthur JR. The glutathione peroxidases. 2000. *Cell Mol Life Sci.* 57:1825-1835.

Avunduk MC, Yurdakul T, Erdemli E, Yavuz A. 2003. Prevention of renal damage by alpha tocopherol in ischemia and reperfusion models of rats. *Urol Res.* 31:280-285.

Baker GL, Corry RJ, Autor AP. 1985. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg.* 202:628-641.

Baud L, Ardaillou R. 1986. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol.* 251:F765-F776.

Benov L. 2001. How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma.* 217:33-36.

Bhaskar L, Mathan MM, Balasubramanian KA. 1995. Oxygen free radical-induced damage during colonic ischemia/reperfusion in rats. *Mol Cell Biochem.* 151:9-14.

Block E, Cai X-J, 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.

Block E. 1985. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am.* 252:114-119.

Cárdenas-Rodríguez N, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. 2006. El óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno: aspectos básicos e importancia biológica. *Educ Quím.* 17:443-451.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2005. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educ Quím.* 17:114-123.

Cassina A, Radi R. 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 328:309-316.

Castro del Pozo, S. de. 2000. Insuficiencia renal aguda y crónica. En: *Manual de patología general: etiología, fisiopatología, semiología, síndromes.* Masson. 5ª ed. Barcelona, España. pp. 301-308.

Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemermann C. 2000. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.* 58:658-673.

Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemermann C. 2002. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 61:862-871.

Chatterjee PK, Patel NS, Sivarajah A, Kvale EO, Dugo L, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C. 2003. GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 63:853-865.

Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. 2006. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Invest Clin.* 58:350-358.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patología celular I: lesión y muerte celulares.* En: Robbins, patología estructural y funcional. 2000. McGraw-Hill Interamericana de España. 6ª ed. Madrid, España. pp. 1-31.

Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL, Kader KN. 2006. Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 40:2206-2213.

Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL, Kader KN. 2006. Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 40:2206-2213.

Dalsing MC, Grosfeld JL, Shiffler MA, Vane DW, Hull M, Baehner RL, Weber TR. 1983. Superoxide dismutase: a cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg Res.* 34:589-596.

Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, Miyaji T, McLeroy P, Nibhanupudy B, Li S, Star RA. 2001. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int.* 60:2118-2128.

Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. 2000. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem.* 205:1-11.

Eberhardt MK. 2000. The pros and cons of living in an oxygen atmosphere, and, Chemistry of oxygen derived radicals. In: *Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences.* CRC Press LLC. USA. pp. 1-11; 77-83.

Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK. 2006. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urol Res.* 34:41-46.

Eschwege P, Paradis V, Conti M, Holstege A, Richet F, Deteve J, Menager P, Legrand A, Jardin A, Bedossa P, Benoit G. 1999. *In situ* detection of lipid peroxidation by-products as markers of renal ischemia injuries in rat kidneys. *J Urol.* 162:553-557.

Fernandes E, Gomes A, Costa D, Lima JL. 2005. Pindolol is a potent scavenger of reactive nitrogen species. *Life Sci.* 77:1983-1992.

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertini A, Visioli O. 1985. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defences against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 17:937-945.

Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem.* 268:22369-22376.

Floriano-Sanchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sanchez-Gonzalez DJ, Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res.* 40:523-533.

Gao YT, Panda SP, Roman LJ, Martasek P, Ishimura Y, Masters BS. 2007. Oxygen metabolism by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 282:7921-7929.

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* 23:345-350.

Gill PS, Wilcox CS. 2006. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal.* 8:1597-1607.

Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. 2002. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int.* 61:855-861.

Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces $O_2^{\bullet-}$ in posthypoxic injury of renal epithelial cells. 1992. *Am J Physiol.* 263:F251-F255.

Grekas D, Dioudis C, Papageorgiou G, Iliadis S, Zilidis C, Alivanis P, Dimitriadou A, Tourkantonis A. 1996. Lipid peroxidation after acute renal ischemia and reperfusion in rats: the effect of trimetazidine. *Ren Fail.* 18:545-552.

Gutteridge JM. 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact.* 91:133-140.

Guyton. 1997. Formación de la orina en los riñones: I. Filtración glomerular, riego sanguíneo renal y su circulación. En: *Tratado de Fisiología Médica*. Mc Graw Hill Interamericana. Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A. 9ª ed. pp. 343-360.

Haddad IY, Crow JP, Hu P, Ye Y, Beckman J, Matalon S. 1994. Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. *Am J Physiol.* 267:L242-249.

Halliwell B, Gutteridge J. 1999. Oxygen is a toxic gas-an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species, and, Antioxidant defences. In: *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford, University Press. 3ª ed. USA. pp. 7-35; 106, 107.

Hansberg-Torres W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. En: *Mensaje bioquímico*. Cea-Bonilla A, del Arenal-Mena IP, Riveros-Rosas H, Vázquez-Contreras E (eds). Depto Bioquímica, Fac Medicina. México, DF. Vol. XXVI. pp.19-54.

Hare RS. 1950. Endogenous creatinine in serum and urine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 74:148-151.

Higuchi O, Tateshita K, Nishimura H. 2003. Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human low-density lipoprotein (LDL) oxidation in vitro. *J Agric Food Chem.* 51:7208-7214.

Ho SE, Ide N, Lau BH. 2001. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine* 8:39-46.

Holum JR. 2001. Metabolismo de los compuestos nitrogenados. En: *Fundamentos de Química General, Orgánica y Bioquímica para Ciencias de la Salud*. Limusa Wiley. 6ª ed. México. pp. 778-790.

Hsu CC, Huang CN, Hung YC, Yin MC. 2004. Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr* 134:149-152.

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, Lau BH. 1999. S-allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Dev Ind Pharm* 25:619-624.

Ide N, Lau BH. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *J Nutr* 131:1020S-1026S.

Ito Y, Ito M, Takagi N, Saito H, Ishige K. 2003a. Neurotoxicity induced by amyloid beta-peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cysteine, a garlic compound. *Brain Res* 985:98-107.

Ito Y, Kosuge Y, Sakikubo T, Horie K, Ishikawa N, Obokata N, Yokoyama E, Yamashina K, Yamamoto M, Saito H, Arakawa M, Ishige K. 2003b. Protective effect of S-allyl-L-cysteine, a garlic compound, on amyloid beta-protein-induced cell death in nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *Neurosci Res* 46:119-125.

Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. 2000. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int.* 85:1007-1013.

Kabasakal L, Sehirli O, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, Sener G. 2005. Protective effect of aqueous garlic extract against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Med Food.* 8:319-326.

Kadkhodae M, Endre ZH, Towner RA, Cross M. 1995. Hydroxyl radical generation following ischaemia-reperfusion in cell-free perfused rat kidney. *Biochim Biophys Acta.*1243:169-174.

Kim AR, Zou Y, Kim HS, Choi JS, Chang GY, Kim YJ, Chung HY. 2002. Selective peroxynitrite scavenging activity of 3-methyl-1,2-cyclopentanedione from coffee extract. *J Pharm Pharmacol.* 54:1385-1392.

Kim JM, Lee JC, Chang N, Chun HS, Kim WK. 2006. S-Allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free Radic Res.* 40:827-835.

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, Kanezawa 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.

Komurai M, Ishii Y, Matsuoka F, Toyama K, Ominato M, Sato T, Maeba T, Kimura K, Owada S. 2003. Role of nitric oxide synthase activity in experimental ischemic acute renal failure in rats. *Mol Cell Biochem.* 244:129-133.

Konya L, Szenasi G, Bencsath P, Feher J. 1991. Study of the effect of superoxide dismutase on acute renal failure in dogs. *Acta Med Hung.* 48:79-85.

Kosuge Y, Koen Y, Ishige K, Minami K, Urasawa H, Saito H, Ito Y. 2003. S-allyl-L-cysteine selectively protects cultured rat hippocampal neurons from amyloid beta-protein- and tunicamycin-induced neuronal death. *Neuroscience* 122:885-895.

La Cruz VP, Gonzalez-Cortes C, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Andres-Martinez L, Santamaria A. 2006. Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Res Bull* 68:379-383.

Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 71:952-958.

Lawson LD. 1993. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products. In: *Human Medicinal agents from plants.* Kinghorn AD, Balandrin MF (eds.). ACS Symposium Series 534. Washington, DC: pp. 306-330.

Lawson LD. 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. Lawson LD, Bauer R (eds.). ACS Symposium Series 691; American Chemical Society. Washington, DC: pp. 176-209.

Leeson TS, Leeson TS, Paparo AA. 1990. Aparato urinario. En: *Texto/Atlas de Histología*. Mc Graw Hill Interamericana. México. pp. 535-567.

Li C, Jackson RM. 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282:C227-C241.

Liang LP, Patel M. 2004. Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J Neurochem*. 90:1076-1084.

Lin CC, Yin MC, Hsu CC, Lin MP. 2004. Effect of five cysteine-containing compounds on three lipogenic enzymes in Balb/cA mice consuming a high saturated fat diet. *Lipids* 39:843-848.

Lomonosova EE, Kirsch M, Rauen U, de Groot H. 1998. The critical role of Heps in SIN-1 cytotoxicity, peroxynitrite versus hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 24:522-528.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.

Maia L, Vala A, Mira L. 2005. NADH oxidase activity of rat liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase-contribution for damage mechanisms. *Free Radic Res*. 39:979-986.

Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2003. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 35:317-324.

Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. 2005. Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 129:236-241.

Martin HM, Hancock JT, Salisbury V, Harrison R. 2004. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infection and immunity*. 72: 4933–4939.

Mates JM, Sanchez-Jimenez F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci*. 15:D339-D345.

Milstien S, Katusic Z. 1999. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 263:681-684.

Ueda, N, Mayeux PR, Baliga R, Shah SV. 2001. Oxidant mechanisms in acute renal failure. In: *Acute renal failure: a companion to Brenner and Rector's The Kidney*. Molitoris BA, Fin WF (eds). Saunders Company, USA. pp. 60-77.

Mehta TR, Dawson R Jr. 2001. Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cells in culture. *Amino Acids*. 20:419-433.

Morihara N, Ide N, Sumioka I, Kyo E. 2005. Aged garlic extract inhibits peroxynitrite-induced hemolysis. *Redox Rep*.10:159-165.

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.

Nagae S, Ushijama 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.

Nakagawa S, Kasuga S, Matsuura H. 1988. Prevention of liver damage by aged garlic extract and its components in mice. *Phytother Res* 1:1-4.

Nishimura H, Higuchi O, Tateshita K. 2004. Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in *Allium* species for human LDL oxidation in vitro. *Biofactors* 21:277-280.

Nishiyama N, Moriguchi T, Morihara N, Saito H. 2001. Ameliorative effect of S-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice. *J Nutr* 131:1093S-1095S.

Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS. 2001. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 281:F948-F957.

Numagami Y, Ohnishi ST. 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr* 131:1100S-11055S.

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.

Okabe H. The role of xanthine dehydrogenase (xanthine oxidase) in ischemia-reperfusion injury in rat kidney. 1996. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 38:577-584.

Park TH, Kim DH, Kim CH, Jung HA, Choi JS, Lee JW, Chung HY. 2004. Peroxynitrite scavenging mode of alaternin isolated from *Cassia tora*. *J Pharm Pharmacol*. 56:1315-1321.

Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Segoviano-Murillo S. 2007. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food Chem Toxicol*. 45:622-627.

Pedraza-Chaverri 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.

Peng Q, Buz'Zard AR, Lau BH. 2002. Neuroprotective effect of garlic compounds in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Med Sci Monit* 8:BR328-BR337.

Pérez-Severiano F, Rodriguez-Perez M, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sanchez-Garcia A, Villeda-Hernandez J, Galvan-Arzate S, Aguilera P, Santamaria A. 2004a. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 45:1175-1183.

Pérez-Severiano F, Salvatierra-Sanchez R, Rodriguez-Perez M, Cuevas-Martinez EY, Guevara J, Limon D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Santamaria A. 2004b. S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol* 489:197-202.

Rendon JL, Mendoza-Hernandez G. 2001. Unfolding kinetics of glutathione reductase from cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Arch Biochem Biophys*. 387:265-272.

Rhoden EL, Pereira-Lima L, Teloken C, Lucas ML, Bello-Klein A, Rhoden CR. 2001. Beneficial effect of alpha-tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *Jpn J Pharmacol*. 87:164-166.

Sanhueza J, Valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A. 1992. Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 78:211-218.

Schrier R W. Atlas of Diseases of the Kidney. 1999. Department of Medicine, University of Colorado School of Medicine Denver. Libre: <http://www.kidneyatlas.org/toc.htm>.

Schwarz C, Oberbauer R. 2003. The influence of organ donor factors on early allograft function. *Curr Opin Urol*. 13:99-104.

Sehirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoglu-Dulger G. 2003. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol*. 16:75-80.

Sener G, Sener E, Sehirli O, Ogunc AV, Cetinel S, Gedik N, Sakarcan A. 2005. Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats. *Pharmacol Res*. 52: 216-222.

Seujang Y, Kittikowit W, Eiam-Ong S, Eiam-Ong S. 2006. Lipid peroxidation and renal injury in renal ischemic reperfusion: effect of angiotensin inhibition. *J Med Assoc Thai*. 89:1686-1693.

Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. 1997. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem*. 272:27812-27817.

Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. 1993. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 125:97-104.

Slot C. 1965. Plasma creatinine determination. *Scand J Clin Lab Invest.* 17:381-387.

Sorensen V, Nilsson U, Pettersson S, Schersten T, Sjoqvist PO, Svensson L, Jonsson O. 1996. Effect of a new inhibitor of lipid peroxidation on kidney function after ischaemia-reperfusion. A study on rat and rabbit kidneys. *Acta Physiol Scand.* 157:289-297.

Stadtman ER, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 25:207-218.

Sundaresan S, Subramanian P. 2003. S-allylcysteine inhibits circulatory lipid peroxidation and promotes antioxidants in N-nitrosodiethylamine-induced carcinogenesis. *Pol J Pharmacol* 55:37-42.

Tan S, Gelman S, Wheat JK, Parks DA. 1995. Circulating xanthine oxidase in human ischemia reperfusion. *South Med J.* 88:479-482.

Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552:335-344.

Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB. 1997. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 29:2571-2583.

Vázquez-Milanés FA, Temístocles-Álvarez DH, y Zacca-Peña E. 2002. Aneurismas aórticos en necropsias. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 3:11-15.

Velmurugan B, Bhuvaneshwari V, Nagini S. 2003. Effect of S-allylcysteine on oxidant-antioxidant status during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and saturated sodium chloride-induced gastric carcinogenesis in Wistar rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 12:488-494.

Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ. 2002. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F20-F28.

Whitin JC, Tham DM, Bhamre S, Ornt DB, Scandling JD, Tune BM, Salvatierra O, Avissar N, Cohen HJ. 1998. Plasma glutathione peroxidase and its relationship to renal proximal tubule function. *Mol Genet Metab.* 65:238-245.

Wrona M, Patel K, Wardman P. 2005. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med.* 38:262-270.

Zhang Z, Blake DR, Stevens CR, Kanczler JM, Winyard PG, Symons MC, Benboubetra M, Harrison R. 1998. A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor. *Free Radic Res.* 28:151-164.

Zhu X, Zuo L, Cardounel AJ, Zweier JL, He G. 2007. Characterization of in vivo tissue redox status, oxygenation, and formation of reactive oxygen species in postischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal.* 9:447-455.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. 2006. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta.* 1757:509-517.