



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE ANTIOXIDANTES
SOBRE LA TOXICIDAD POR PLOMO
EN CÉLULAS DE TÚBULO PROXIMAL
DE RIÑÓN DE CERDO (LLC-PK1)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ANA MARIA CRUZ MUÑOZ



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: Profesor: Pedro Valle Vega
Vocal: Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jiménez
Secretario: Profesora: Diana Barrera Oviedo
1er. Suplente: Profesora: Leticia Gil Vieyna
2do. Suplente: Profesora: Inés Miranda Martínez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 5, Departamento de Farmacología. Sexto piso, Torre de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F.

Financiamiento:

Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN22905 y CONACYT 47993-M

Asesora: _____

Dra. Diana Barrera Oviedo

Sustentante: _____

Ana María Cruz Muñoz

AGRADECIMIENTOS:

A la QFB Miriam Gabriela Carranza Pérez por su ayuda en la realización de los experimentos y en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez por proporcionarnos S-alil cisteína y S-alil mercaptocisteína.

Al Dr. Juan J. Mandoki Weitzner por permitir realizar parte de los experimentos en su laboratorio.

Al Dr. Nicandro Mendoza Patiño por su asesoría en el análisis estadístico de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS:

- A DIOS por que me dio la fortaleza para concluir con uno de mis objetivos en mi vida.
- A mi MAMA que es la persona que siempre ha sido mi ejemplo. Por todo su apoyo incondicional y que siempre me dio el ejemplo de que en la vida, todo cuanto uno quiere se puede lograr. Gracias madre te quiero mucho!!!
- A mis HERMANOS que siempre estuvieron conmigo, aunque me hacían desviar en todo momento pero aun así fueron un gran impulso por que todo cuanto me propuse era para demostrarles que si se podía.
- Y finalmente a mi Asesora Diana, muchas gracias por todo lo que me ayudaste para poder obtener el título que en algún momento pensé ya no podría obtener, sin tu ayuda no lo hubiera logrado.

DEDICATORIA:

Este trabajo lo dedico a una de las personas más importantes en mi vida, mi Madre, por que con sus regaños y consejos he llegado hasta este punto de mi vida y por que siempre estuvo apoyándome en todo momento.

INDICE

I. ANTECEDENTES	1
1. Estrés oxidativo	1
1.1. Radicales libres	1
1.1.1. El anión superóxido	1
1.1.2. Peróxido de hidrógeno	2
1.1.3. Hidroxilo	2
1.1.4. Óxido nítrico	2
1.1.5. Efectos de las ERO	2
2. Sistemas antioxidantes	3
2.1. Antioxidantes no enzimáticos exógenos	4
2.1.1. Ácido ascórbico	4
2.1.2. Curcumina	4
2.1.3. S-alil cisteína (SAC) y S-alil-mercaptocisteína (SAMC)	5
2.1.4. N-acetil cisteína	5
2.1.5. Piruvato	6
2.1.6. Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)ona)	6
2.1.7. DMTU (Dimetil tiourea)	6
2.1.8. Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy)	6
3. Plomo	7
3.1. Efectos del plomo en el organismo	7
II. INTRODUCCIÓN	8
III. HIPÓTESIS	9
IV. OBJETIVO GENERAL	9
V. OBJETIVOS PARTICULARES	9
VI. METODOLOGÍA	10
1. Materiales	10
2. Cultivo de las células LLC-PK1	10
3. Tratamiento con antioxidantes	10
4. Determinación de la viabilidad celular	11
4.1. Reducción de MTT	11
4.2. Tinción con cristal violeta	12

5. Evaluación del estrés oxidativo	12
VII. RESULTADOS	13
1. Modelo de toxicidad por acetato de plomo en células LLCPK1	13
2. Efecto de los antioxidantes sobre la toxicidad por acetato de plomo en células LLCPK1	13
3. Efecto de los antioxidantes sobre la cantidad de peroxinitrito en la toxicidad por acetato de plomo en células LLCPK1	18
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS	24
IX. CONCLUSIONES	26
X. REFERENCIAS	27

I. ANTECEDENTES

1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la pérdida de equilibrio entre la generación de oxidantes y la actividad antioxidante o como el efecto adverso que se produce en los tejidos de los organismos cuando existe un incremento de la disfuncionalidad de sus moléculas causadas por radicales libres.

1.1. Radicales libres

Las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos son los radicales libres. Se considera un radical libre cualquier molécula que contenga uno o más electrones sin aparear.

La reducción incompleta del oxígeno bimolecular genera intermediarios conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO). En el metabolismo aerobio se producen constantemente pequeñas cantidades de ERO, incluyendo radicales hidroxilo (OH^\bullet), aniones superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies son generadas durante los procesos biológicos normales por las células (en la cadena de electrones, en la oxidación de xenobióticos, en la regulación del factor de relajación del músculo liso, en la eliminación bacteriana en los procesos infecciosos, entre otros) (Rice, 1994).

1.1.1. El anión superóxido

El $\text{O}_2^{\bullet-}$ es el resultado de la reacción del oxígeno con las proteínas que contienen hierro y azufre y también con la ubiquinona parcialmente reducida y el citocromo b del complejo III. Otra fuente importante de $\text{O}_2^{\bullet-}$ son los fagocitos activados que producen una gran cantidad de este radical como mecanismo protector frente a organismos extraños.

1.1.2. Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 se produce por la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, existiendo mecanismos de detoxificación del H_2O_2 efectuados por la catalasa y por la glutatión peroxidasa que lo transforman en agua. Está considerado la ERO menos reactiva pero dispone de una vida media más larga, con lo cual puede difundir y atravesar membranas, generando otras ERO.

1.1.3. Hidroxilo

El radical libre más activo y con mayor capacidad para alterar moléculas es el hidroxilo (OH^{\bullet}), por tanto una producción excesiva de este radical puede provocar efectos nocivos importantes. Se genera a partir de H_2O_2 mediante la reacción de Fenton o de Haber Weiss.

1.1.4. Óxido nítrico

Dentro del grupo de los radicales libres está el óxido nítrico (NO) que es producido por el endotelio vascular. El exceso de dicho radical puede ser tóxico para el organismo.

1.1.5. Efectos de las ERO

Las ERO pueden reaccionar con diferentes moléculas biológicas como las proteínas, los ácidos grasos y los carbohidratos, modificando su función y/o localización (Rice, 1994). Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica cuya prevención es fundamental en todos los organismos aerobios, ya que los productos derivados de este proceso pueden interactuar con el DNA, siendo potencialmente mutágenos. Los epóxidos formados pueden reaccionar espontáneamente con centros nucleofílicos en la célula o unirse a los ácidos nucleicos (DNA y RNA). Esta reacción puede ocasionar citotoxicidad, alergia, mutagénesis o carcinogénesis, dependiendo de las propiedades del epóxido.

Existe una variedad de condiciones patológicas en las que se cree que están involucradas las ERO, como por ejemplo: cáncer, artritis reumatoide, enfermedades respiratorias como fibrosis pulmonar, padecimientos neurológicos, isquemia reperusión y enfermedades mediadas por complejos inmunes. En el caso de las enfermedades renales, se tiene evidencia que las ERO juegan un papel muy importante en el origen de la glomérulonefritis por anticuerpos anti-membrana basal, en la nefritis nefrotóxica, en la nefropatía crónica por el péptido natriurético atrial, en el síndrome nefrótico de cambios mínimos, en la neuropatía por lupus, en la glomérulo nefritis post-estreptococcica, en la neuropatía por IgA y en la insuficiencia renal aguda.

2. Sistemas antioxidantes

Los organismos cuentan con antioxidantes y un multisistema enzimático de defensa contra el estrés oxidativo (Tabla1). Los antioxidantes son moléculas capaces de reaccionar directamente con las ERO o con moléculas reactivas. El multisistema enzimático es capaz de transformar algunas de estas ERO. Las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa.

Tabla 1. Sistemas de defensa antioxidante

Enzimáticos	No enzimáticos	
	Endógenos	Exógenos
Superóxido dismutasa (SOD) Glutatión peroxidasa (GPX) Catalasa (CAT) Glutatión reductasa (GR)	Glutatión Ubiquinona Ácido úrico Proteínas	Ácido ascórbico (vit. C) Alfa tocoferol (vit. E) Betacaroteno Vitamina A Flavonoides Ácidos fenólicos Oligoelementos Selenio (Se) Cobre (Cu) Zinc (Zn) Manganeso (Mn)

2.1. Antioxidantes no enzimáticos exógenos

Los antioxidantes son importantes porque pueden ser capaces de prevenir la formación de radicales libres e intervenir para neutralizar los ya existentes, por esta razón se les ha acuñado el título de “bioprotectores”. Hay compuestos naturales de plantas que protegen células, tejidos y órganos del cuerpo de numerosas influencias internas y externas.

Muchas vitaminas, minerales y compuestos tales como los carotenos, los flavonoides y los polifenoles tienen la habilidad de neutralizar los radicales libres.

2.1.1. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C, es un ácido orgánico y un antioxidante perteneciente al grupo de vitaminas hidrosolubles. No se sintetiza en el organismo, por lo cual tiene que ser aportada en la dieta. Se encuentra, principalmente en verduras y frutas frescas y en los zumos de cítricos. Este compuesto conocido como ascórbico procede de su capacidad para prevenir y curar el escorbuto. El ácido ascórbico se requiere para formar el colágeno y por tanto es muy importante en el crecimiento y en la reparación de todos los tejidos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La vitamina C se encuentra dentro y fuera de la célula, eliminando el radical hidroxilo y el anión superóxido, formando ácido dehidroascórbico que es eliminado por el glutatión.

2.1.2. Curcumina

La *Curcuma longa*, es una planta de origen asiático muy usada como una especie en la cultura asiática. El principal componente es la curcumina, uno de los ingredientes activos responsables de su actividad biológica. Se sabe que esta sustancia es estable en el estómago y en el intestino delgado. La curcumina es altamente lipofílica, lo que le permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva. Sus principales

metabolitos también son bioactivos. Se han descrito su actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria, así como su efecto antioxidante y antiinflamatorio, a través de la modulación del metabolismo de los icosanoides. Además se sabe que los curcuminoides atrapan los potentes radicales superóxido e hidroxilo y previenen la peroxidación lipídica (Mesa et al., 2000).

2.1.3. S-alil cisteína (SAC) y S-alil-mercaptocisteína (SAMC)

El ajo contiene compuestos azufrados, entre los cuales están la S-alil-cisteína, la S-alil-mercaptocisteína, la S-metil-cisteína y la γ -glutamyl-cisteína. Se ha observado que estos compuestos protegen a las membranas celulares hepáticas frente a la agresión de peróxidos lipídicos. También protegen al endotelio vascular frente al peróxido de hidrógeno (Amagase, 2006).

La SAC es capaz de reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , singulete de oxígeno (O_2^1), HOCl y ONOO⁻ (Chung, 2006; Ide and Lau, 2001; Kim et al., 2006; Maldonado et al., 2003; Medina-Campos et al., 2007).

La SAC y la SAMC tienen una gran actividad antioxidante (Numagami et al., 1996), tienen efecto hepato-protector (Nakagawa et al., 1988), reducen el riesgo de necrosis en el hígado por acetaminofen (Sumioka et al., 1998).

La SAMC es capaz de inhibir el crecimiento celular (arresta en la fase M del ciclo celular) e induce la apoptosis en células de cáncer humano de colon (Lau et al., 1987).

2.1.4. N-acetil cisteína

La N-acetil cisteína aporta una protección anti-oxidante intracelular, se le considera como “limpiador de radicales libres”, mantiene la función inmunitaria y posee propiedades anti-virales; así mismo inhibe la muerte celular programada.

La N-acetil-cisteína elimina efectivamente al OH^{\bullet} , el H_2O_2 y el ácido hipocloroso y en menor proporción inhibe al $O_2^{\bullet-}$. Un mecanismo importante de la N-acetil-cisteína es mantener el nivel de glutatión (el principal antioxidante endógeno) en la célula (Aruoma et al., 1989).

2.1.5. Piruvato

El piruvato es un alfa-ceto-ácido, el producto final de la glicólisis y un potente antioxidante (Halliwell y Gutteridge., 1999). Se ha sugerido que el piruvato reacciona directamente con el H_2O_2 , debido a que disminuye el daño que provoca el H_2O_2 en modelos *in vitro* e *in vivo* (Salahudeen et al., 1991; Varma et al., 2006).

2.1.6. Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)ona)

El Ebselen es un compuesto seleno- orgánico, liposoluble, que mimetiza la acción de la glutatión peroxidasa e inhibe la peroxidación lipídica (Lapchak y Zivin, 2003; Muller et al., 1984). El Ebselen tiene efecto protector, es capaz de inhibir la apoptosis y disminuye el estrés oxidativo en isquemia cerebral (Yamaguchi et al., 1998; Sarker et al., 2003; Bozena y Andrzej, 2006). El Ebselen es una defensa contra el peroxinitrito, es capaz de prevenir, evitar o reparar el daño que produce el peroxinitrito (Arteel et al, 1999; Lars-Oliver y Helmut, 2003).

2.1.7. DMTU (Dimetil tiourea)

Es un antioxidante con una gran capacidad para atrapar a los OH^\bullet . Se ha descrito que tiene efecto protector contra cisplatina en células renales y hepáticas (Baek et al., 2003; dos Santos et al., 2007) y en un modelo de diabetes (Cameron et al., 2001).

2.1.8. Tempol (4-hidroxi-2 ,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy)

Los compuestos nitróxido incluyendo el tempol son radicales libres estables de bajo peso molecular y permeables de la membrana. El tempol mimetiza la acción de la superóxido dismutasa, eliminando el radical superóxido (Samuni et al., 1991a). El tempol es un radical libre nitróxido antioxidante que tiene efectos neuroprotectores y renoprotectores relacionados con la atenuación de la producción del radical superóxido

(Manning et al., 2003). El tempol protege contra el estrés oxidativo en cardiomiocitos (Samuni et al., 1991b) y en radioterapia (Hahn et al., 1992).

3. Plomo

El plomo forma parte de numerosos procesos industriales, destacando su presencia en la industria automovilística, específicamente en la fabricación de baterías. Otra fuente de plomo relacionada con el transporte es la gasolina. Se trata de compuestos alquilados, de mayor toxicidad y difusión orgánica que el plomo metálico. Estos aditivos se usan como antidetonantes y las concentraciones permitidas se están reduciendo en el mundo, impactando favorablemente en los niveles de plomo ambiental y en su toxicidad. Asimismo, la existencia de sistemas catalíticos ha impuesto el uso de bencinas sin plomo.

En la industria se encuentra en forma de metal en revestimientos, serpentines y bombas. También se utiliza en la fabricación de distintos compuestos químicos, tuberías, recubrimiento de conductores eléctricos y acumuladores de baterías. Se utiliza en aleaciones con antimonio (Sb) en imprenta, con estaño (Sn) en soldaduras, con arsénico (As) en perdigones de metralla y en pinturas antioxidantes. También es usado en colorantes para base de pintura y barnices (blancos: albayalde, cerusa y amarillos), como acetato de plomo en la industria cosmética, como arseniato en insecticidas agrícolas, como carbonato en el estudio de huellas dactilares.

3.1. Efectos del plomo en el organismo

El plomo, es un metal tóxico, el cual no tiene función biológica en ningún sistema enzimático. El plomo desplaza al calcio de los órganos donde se encuentra, tal como los huesos y dientes; y a su vez altera las enzimas que requieren del calcio y del magnesio (Goyer, 1989).

La exposición al plomo produce trastornos metabólicos en relación directa a su concentración. Las alteraciones pueden llevar a la muerte y en grado variable puede

deteriorar la capacidad intelectual, alterar el comportamiento, bloquear la hematopoyesis, causar neuropatía periférica y toxicidad renal (Witzmann et al., 1999).

II. INTRODUCCIÓN

El plomo es un metal que produce nefrotoxicidad luego de una acumulación por una exposición prolongada, la cual está asociada con el daño a túbulo proximal, caracterizado por aminoaciduria, fosfaturia y glicosuria (Goyer, 1989). Recientes reportes indican que la exposición aguda al plomo está asociada al daño renal. Este daño está caracterizado por lipoperoxidación e incremento de la actividad de enzimas antioxidantes en túbulo proximal (Othman y Missiry, 1998; Daggett et al., 1998; Witzmann et al., 1999), lo que se cree que precede a un daño renal irreversible.

El mecanismo mediante el cual el plomo produce daño renal no está bien caracterizado pero existe una relación con el estrés oxidativo, el cual se presenta en humanos (Ito et al., 1985; Hunaiti y Soud 2000, Sagawara et al., 1991) y en animales de experimentación (Adonaylo y Oteiza, 1999; Correa et al., 1999; Ercal et al., 2000). En estudios in vitro se observó la producción de ERO en células endoteliales de aorta (Vaziri y Ding, 2001) y en astrocitos de hipocampo de rata (Cabell et al., 2004) expuestos a plomo.

En algunos modelos de exposición a plomo, se encontró que con una mezcla de antioxidantes muestran una disminución en el estrés oxidativo en cerebro de ratas perinatales (Antonio-Garcia y Masso-Gonzalez, 2008). El ácido ascórbico protege de la apoptosis neurodegenerativa en ratas expuestas a acetato de plomo (Jung-Mi et al., 2007). Los curcuminoides son capaces de evitar la disminución de la memoria (Dairam et al., 2007) y la DMTU normaliza la presión arterial y el estrés oxidativo en ratas intoxicadas con plomo (Ding et al., 2001).

III. HIPÓTESIS

Si el plomo genera radicales libres que son dañinos a las células y los antioxidantes reaccionan con los radicales libres, entonces, los antioxidantes evitarán el daño en las células LLC-PK1 ocasionado por el acetato de plomo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que tienen algunos antioxidantes sobre la toxicidad inducida por el acetato de plomo en células LLC-PK1.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer el modelo de toxicidad del acetato de plomo en células LLC-PK1.
2. Caracterizar el efecto de antioxidantes sobre la viabilidad de células LLC-PK1 en el modelo de toxicidad por acetato de plomo.
3. Caracterizar la participación del estrés oxidativo en el modelo de toxicidad por acetato de plomo en células LLC-PK1.

VI. METODOLOGÍA

1. Materiales

El acetato de plomo, ácido acético al 96% de JT Baker (México), Medio Dubelco's Eagle Modificado (DMEM), Suero fetal bovino certificado, Tripsina-EDTA 0.25% de Gibco (N.Y, EUA), Piruvato, N-acetil cisterna, Ácido ascórbico, Curcumina, Ebselen, DMTU, Tempol, Glutaraldehído 25%, Cristal violeta 91.3%, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio (MTT), ácido clorhídrico, dihidrorodamina 123 de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), células LLC-PK1 de ATCC (EUA). S-alil cisteína y s-alil-mercaptocisteína fueron proporcionadas por la Dra. Perla D Maldonado.

2. Cultivo de las células LLC-PK1

Los estudios se realizaron en una línea celular de túbulo proximal bien caracterizada y ampliamente utilizada (LLC- PK1). Las células se cultivaron en cajas Petri de 10 cm con medio DMEM y suero fetal bovino al 10% y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de O₂ con 5% de CO₂. Las células se subcultivaron dos veces por semana después de que alcanzaron el 80% de confluencia. Para ello, las células se lavaron con amortiguador de fosfatos y se desprendieron con tripsina al 0.25% para hacer la transferencia a nuevas cajas Petri. Para realizar los experimentos, las células se sembraron en cajas de 96 pozos y los experimentos se realizaron cuando alcanzaron la confluencia, usualmente 1 a 2 días después.

3. Tratamiento con antioxidantes

Después de sembrar las células en las placas de 96 pozos y transcurridas 24h, se incubaron o no 6 h con el antioxidante (preincubación). Posteriormente se cambio el medio por antioxidante, acetato de plomo o ambos, dependiendo del grupo. Todas las soluciones se prepararon en medio DMEM con suero fetal bovino (SFB) al 1% (DMEM/SFB 1%). Los grupos utilizados son los siguientes:

1. 24 h con medio DMEM/SFB 1%
2. 24h con acetato de plomo (AcPb)
3. 6h de preincubación con antioxidante + 24h con DMEM/SFB 1%
4. 6h de preincubación con antioxidante + 24h con antioxidante
5. 6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb
6. 6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb y antioxidante
7. 24h con AcPb y antioxidante

Los antioxidantes utilizados fueron: curcumina (Cur) [1, 10 μ M], ácido ascórbico (Asc) [0.2, 2 mM], s-alil-cisteína (Sac) [2, 20 mM], s-alil-mercaptocisteína (Samc) [50, 500 μ M], piruvato (Pir) [1, 10 mM], N-acetil-cisteína (Nac) [1, 10 mM], Ebselen [2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)ona] (Ebs) [0.1, 1 μ M], Dimetil tiourea (Dmtu) [0.2, 2 mM], Tempol [4-hidroxi-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy] (Tem) [4, 40 μ M].

Al finalizar el ensayo se determinó la viabilidad y la cantidad de peroxinitrito presente. Los ensayos se realizaron por triplicado (n de 3) y se repitieron al menos en 3 ocasiones. Las gráficas se realizaron con los promedios de todos los ensayos.

4. Determinación de la viabilidad celular

4.1. Reducción de MTT

Se adicionó MTT a las células, 4 h antes de que concluyera el tratamiento correspondiente, a una concentración final de 0.2 mg/mL. El MTT es reducido a formazán de MTT (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazán) en las mitocondrias de células vivas por el sistema de deshidrogenasas. El MTT es de color amarillo, soluble en agua y su forma reducida, formazán de MTT, es de color púrpura e insoluble en agua. Una vez terminado el tiempo de incubación se lavaron las células con PBS para eliminar el MTT no reducido. El formazán de MTT contenido en las células se disolvió en una solución de isopropanol ácido (HCl 1% en isopropanol). La concentración de

formazán de MTT es proporcional al número de células vivas y se midió espectrofotométricamente a 570 nm.

4.2. Tinción con cristal violeta

Una vez terminado el tratamiento a las células, se eliminó el medio de cultivo que contenían los pozos y se lavaron con PBS para eliminar las células muertas. Las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1%, se incubaron con cristal violeta durante 15 minutos y se lavaron con agua corriente hasta que el agua salió clara. Se dejaron secar al aire libre y se adicionó ácido acético al 10% para disolver el colorante. Se determinó la absorbancia a 595 nm. El cristal violeta es un colorante que se une inespecíficamente a las proteínas, por lo que hay una relación directa entre la cantidad de proteína medida por este colorante y el número de células.

5. Evaluación del estrés oxidativo

Cuantificación de peroxinitrito (oxidación de dihidrorodamina).

Al término del ensayo, las células se lavaron 2 veces con PBS. Se les adicionó una solución de dihidrorodamina 123 50 μM en PBS y se incubó por 3 h a 37°C. Se determinó la absorbancia a 500 nm en un lector de microplacas y se calculó la cantidad de peroxinitrito ($E_m=78000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El peroxinitrito oxida a la dihidrorodamina 123 a rodamina. La dihidrorodamina no absorbe a 500 nm pero la rodamina si absorbe (Haddad et al., 1994).

VII. RESULTADOS

1. Modelo de toxicidad por acetato de plomo en células LLCPK1

En la figura 1 se observan las curvas de dosis-respuesta para el AcPb, con 2 métodos diferentes para medir la viabilidad (reducción de MTT y cristal violeta). Utilizando el método de MTT la CL_{50} es de $1.2 \mu\text{M}$ y con el método de cristal violeta la CL_{50} es de $2 \mu\text{M}$. En ensayos subsecuentes se utilizó el método de cristal violeta y la concentración de $1.5 \mu\text{M}$.

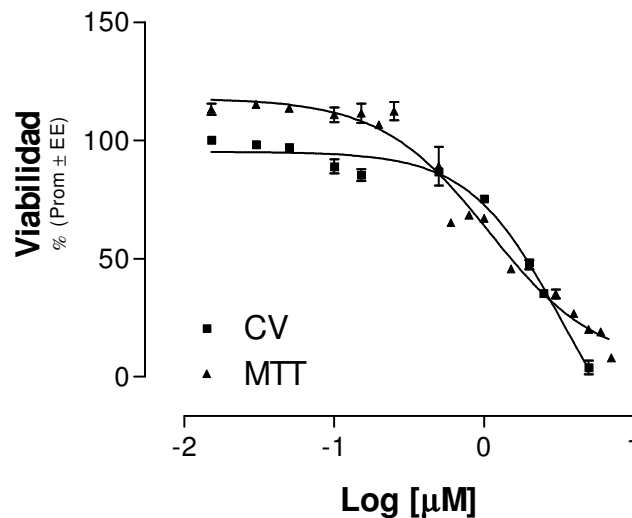


Figura 1. Toxicidad por acetato de plomo en células LLC-PK1. Viabilidad medida por MTT ($CL_{50}=1.2 \mu\text{M}$) y cristal violeta ($CL_{50}=2 \mu\text{M}$). % de Viabilidad (Prom \pm E.E.) n=9.

2. Efecto de los antioxidantes sobre la toxicidad por acetato de plomo en células LLCPK1

El grupo con AcPb (grupo 2 [24h con acetato de plomo]) presenta una viabilidad de aproximadamente 70% respecto al grupo control (grupo 1 [24 h de medio DMEM/SFB 1%]), en todos los experimentos realizados. En los grupos controles de exposición a

antioxidante (grupos 3 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con DMEM/SFB 1%] y 4 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con antioxidante]), se observa una viabilidad semejante a la del control, en todos los experimentos realizados, con todos los antioxidantes utilizados (Figuras 2, 3, 4, 5 y 6).

La Cur y el Asc en las concentraciones utilizadas, no previenen (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) ni protegen (grupos 6 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb y antioxidante] y 7 [24h con AcPb y antioxidante]) a las células LLC-PK1 expuestas al AcPb (Figura 2).

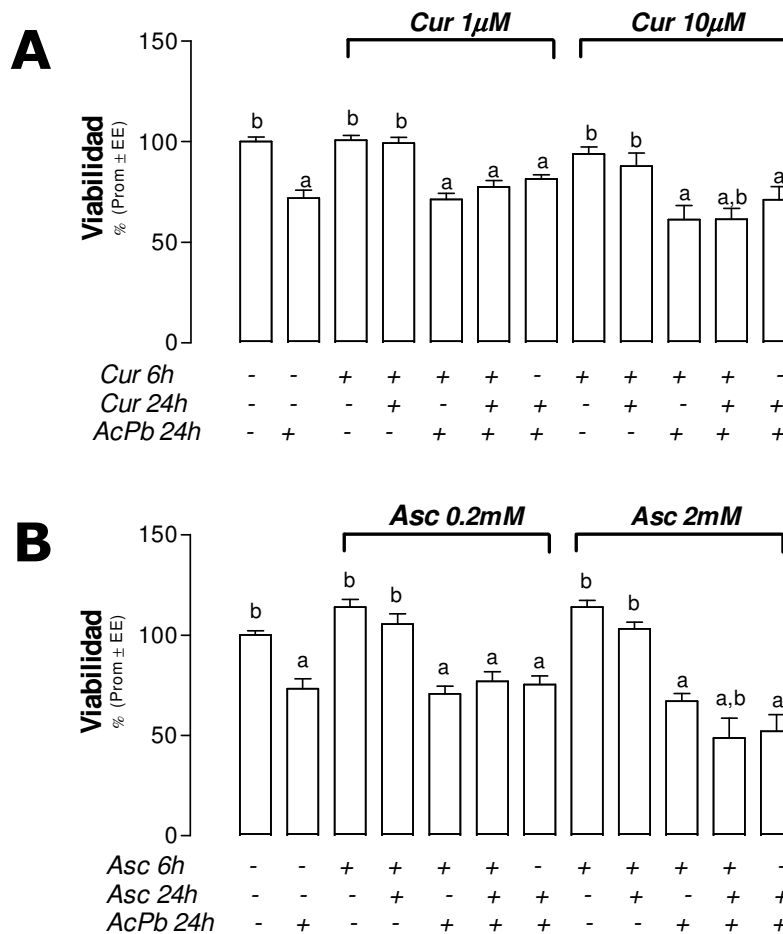


Figura 2. Efecto de la curcumina [Cur] (A) y del ácido ascórbico [Asc] (B) en la toxicidad por AcPb. % de Viabilidad (Prom±E.E.) n=9. ANOVA $P < 0.0001$ y pos-análisis de Bonferroni. ^a $P < 0.05$ vs grupo control, ^b $P < 0.05$ vs grupo de AcPb.

La Sac y la Samc en las dos concentraciones utilizadas, no previenen (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) la muerte de las células LLC-PK1 expuestas al AcPb (Figura 3). La Sac 2 mM protege parcialmente solo cuando se preincuba con antioxidante y luego se coincide con el antioxidante y el AcPb (grupo 6 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb y antioxidante]) (Figura 3A). La Samc 50 μ M protege parcialmente cuando se preincuba o no con antioxidante y luego se coincide con el antioxidante y el AcPb (grupos 6 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb y antioxidante] y 7 [24h con AcPb y antioxidante]). La Samc 500 μ M protege totalmente cuando se coincide con el antioxidante y el AcPb (grupo 7 [24h con AcPb y antioxidante]) (Figura 3B).

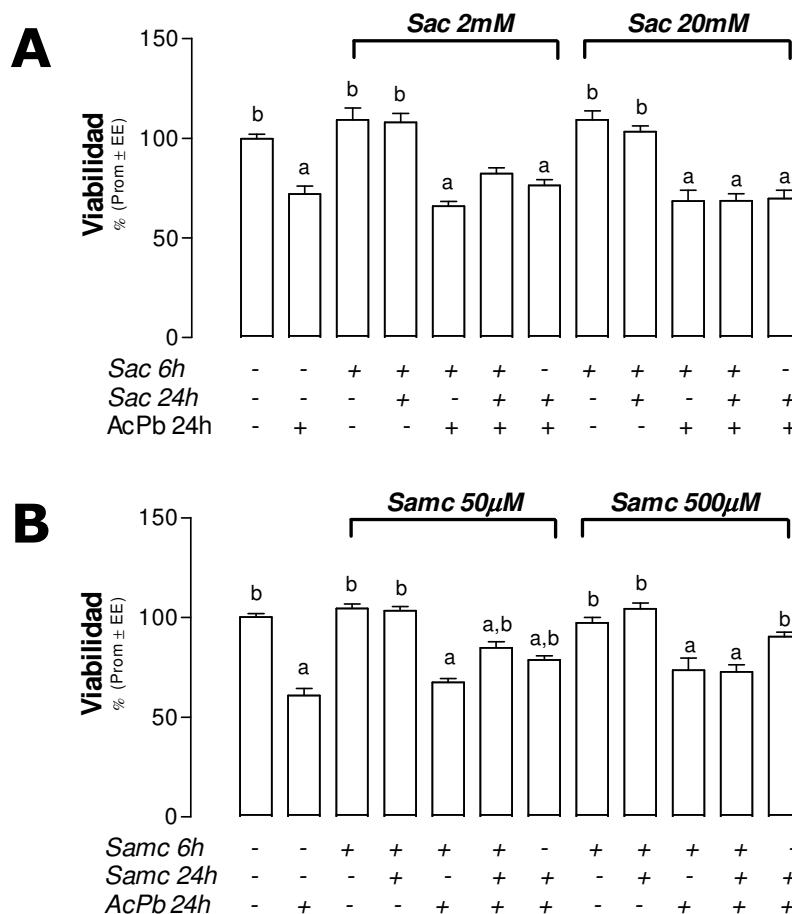


Figura 3. Efecto de la S-alil cisteína [Sac] (A) y de la S-alil-mercaptocisteína [Samc] (B) en la toxicidad por AcPb. % de Viabilidad (Prom \pm E.E.) n=9. ANOVA P<0.0001 y pos-análisis de Bonferroni. ^aP<0.05 vs grupo control, ^bP<0.05 vs grupo de AcPb.

El Pir y la Nac en las dos concentraciones utilizadas, no previenen (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) la muerte de las células LLC-PK1 expuestas al AcPb (Figura 4). El Pir protege parcialmente cuando las células se coincuban con el Pir y el AcPb (grupo 7) y protege totalmente cuando se preincuba con el Pir 10 mM y luego se coincuba con el Pir 10 mM y el AcPb (grupo 6) (Figura 4A). El Nac 10 mM protege totalmente cuando las células se preincuban o no y luego se coincuban con Nac 10 mM y el AcPb (grupos 6 y 7). La concentración de 1 mM de Nac no protege (Figura 4B).

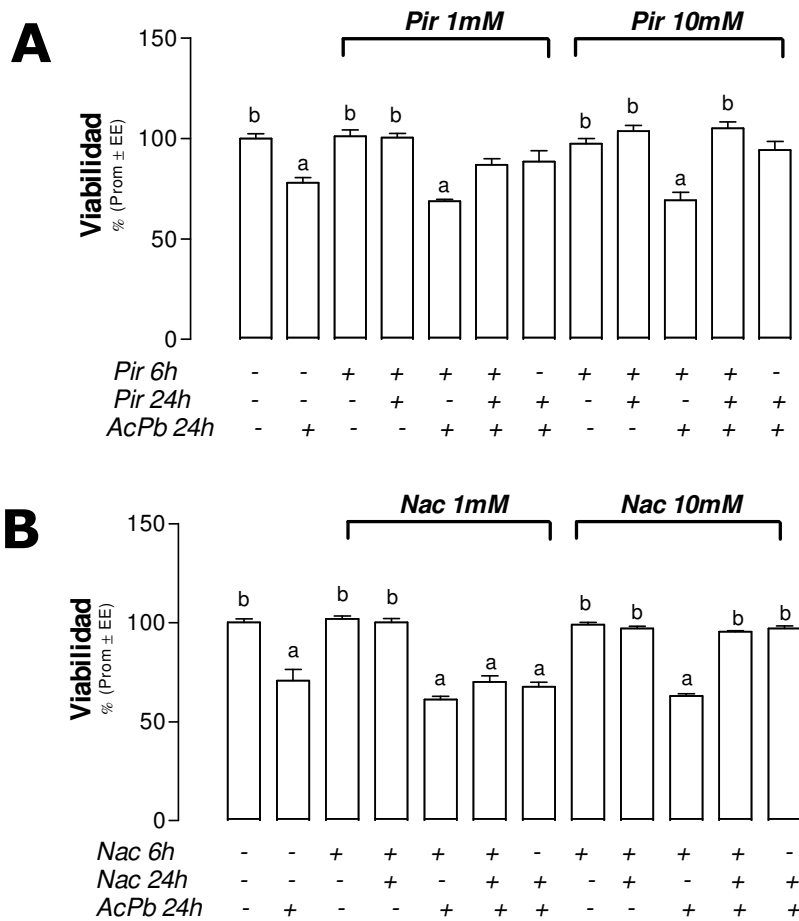


Figura 4. Efecto del Piruvato [Pir] (A) y de la N-acetil cisteína [Nac] (B) en la toxicidad por AcPb. % de Viabilidad (Prom±E.E.) n=9. ANOVA $P < 0.0001$ y pos-análisis de Bonferroni. ^a $P < 0.05$ vs grupo control, ^b $P < 0.001$ vs grupo de AcPb.

El Ebs y Tem en ambas concentraciones utilizadas y el Dmtu 2 mM previenen parcialmente de la muerte celular por AcPb (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) (Figura 5 y 6). El Ebs, el Dmtu y el Tem no protegen en ninguna de las concentraciones utilizadas, cuando se preincuba o no (grupos 6 y 7) (Figura 5 y 6). El Tem 4 μ M al ser coincubado con el AcPb produce mayor muerte celular que el AcPb solo (Figura 6).

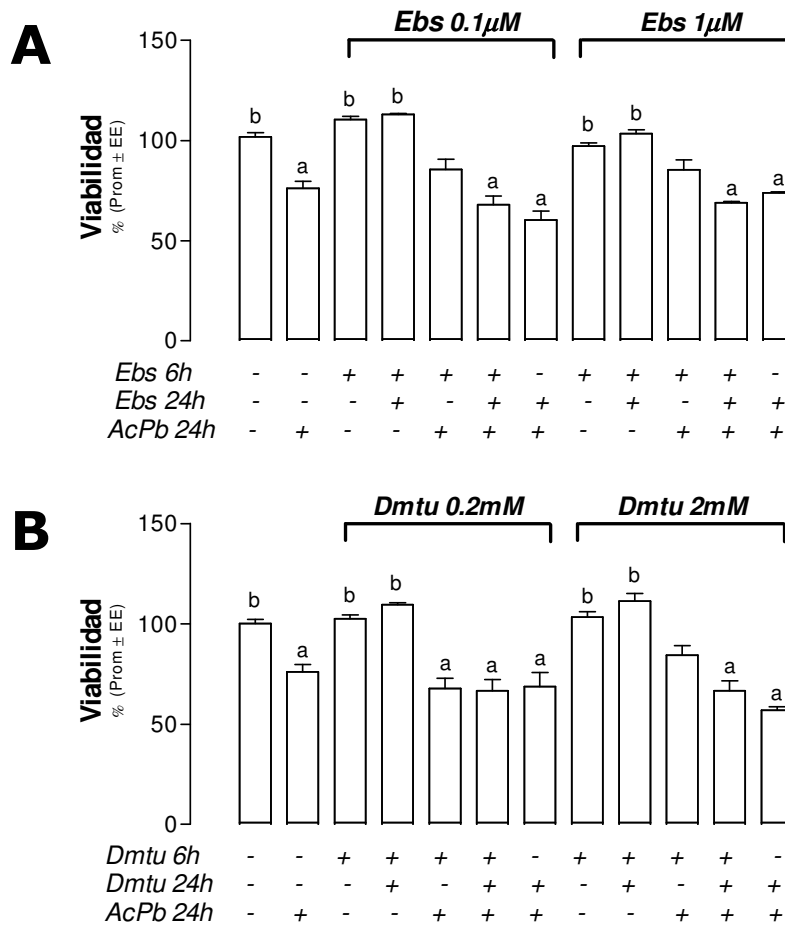


Figura 5. Efecto del Ebselan [Ebs] (A) y de la Dimetil tiourea [Dmtu] (B) en la toxicidad por AcPb. % de Viabilidad (Prom \pm E.E.) n=9. ANOVA P<0.0001 y pos-análisis de Bonferroni. ^aP<0.05 vs grupo control, ^bP<0.01 vs grupo de AcPb.

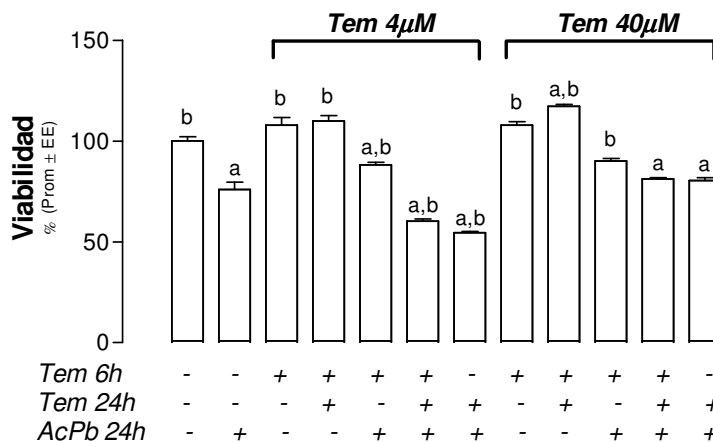


Figura 6. Efecto del Tempol [Tem] en la toxicidad por AcPb. % de Viabilidad (Prom±E.E.) n=9. ANOVA P<0.0001 y pos-análisis de Bonferroni. ^aP<0.05 vs grupo control, ^bP<0.05 vs grupo de AcPb.

3. Efecto de los antioxidantes sobre la cantidad de peroxinitrito en la toxicidad por acetato de plomo en células LLCPK1

El grupo con AcPb (grupo 2 [24h con acetato de plomo]) presenta una mayor concentración de peroxinitrito respecto al grupo control (grupo 1 [24 h de medio DMEM/SFB 1%]), en todos los experimentos realizados.

En los grupos controles de exposición a antioxidantes (Cur, Asc, Nac 10 mM y Ebs) (grupos 3 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con DMEM/SFB 1%] y 4 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con antioxidante]), se observa una concentración de peroxinitrito semejante a la del control, en todos los ensayos realizados. En el grupo 3 de Samc, Dmtu y Tem, se observa un ligero incremento del peroxinitrito. Para estos mismos antioxidantes, en el grupo donde se preincuba 6 h y luego se incuba 24 h con el antioxidante (grupo 4), se observa un nivel peroxinitrito igual al control (Figuras 8B, 10B y 11). En los grupos 3 y 4 de Pir, y Sac se observa un ligero incremento de la concentración de peroxinitrito respecto al grupo control. En el grupo 4 de Nac 1 mM, se observa un ligero incremento del peroxinitrito respecto al grupo control.

La Cur y el Asc en las concentraciones utilizadas, no evita la formación de peroxinitrito (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) ni protegen de su formación (grupos 6 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb y antioxidante] y 7 [24h con AcPb y antioxidante]) a las células LLC-PK1 expuestas al AcPb (Figura 7).

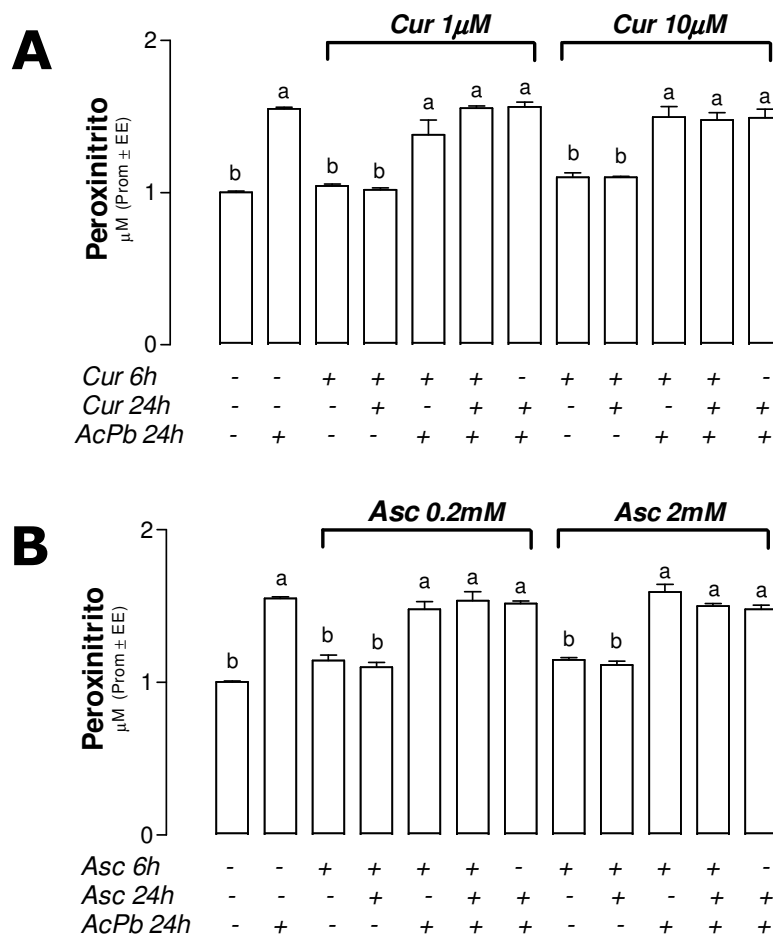


Figura 7. Efecto de la curcumina [Cur] (A) y del ácido ascórbico [Asc] (B) en la cantidad de peroxinitrito en la toxicidad por AcPb. Peroxinitrito [µM] (Prom±E.E.) n=9. ANOVA P<0.0001 y pos-análisis de Bonferroni. ^aP<0.05 vs grupo control, ^bP<0.001 vs grupo de AcPb.

La Sac 2 mM protege parcialmente contra la formación del peroxinitrito cuando se preincuba y luego se coincide con Sac 2 mM y AcPb (grupo 6). La Sac no evita (grupo

5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) la formación de peroxinitrito con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 8A).

La Samc protege parcialmente contra la formación de peroxinitrito cuando se coincuban las células con Samc y AcPb (grupo 7) (Figura 8B). La Samc no previene (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) la formación de peroxinitrito con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 8B).

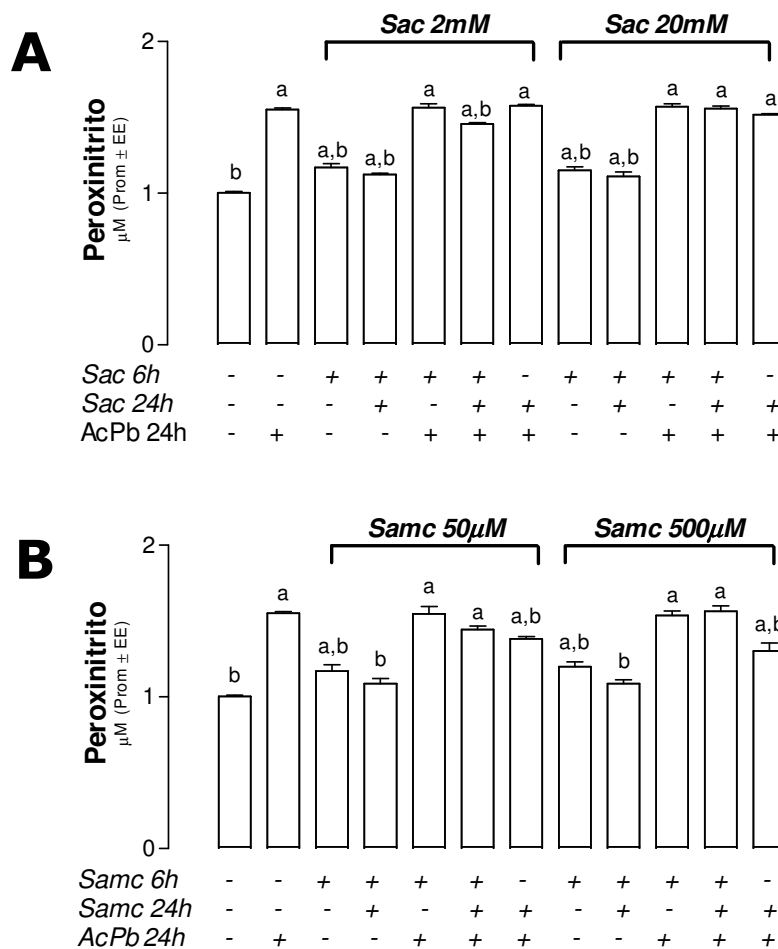


Figura 8. Efecto de la S-alil cisteína [Sac] (A) y de la S-alil-mercaptocisteína [Samc] (B) en la cantidad de peroxinitrito en la toxicidad por AcPb. Peroxinitrito μM (Prom \pm E.E.) n=9. ANOVA $P<0.0001$ y pos-análisis de Bonferroni. ^a $P<0.01$ vs grupo control, ^b $P<0.01$ vs grupo de AcPb.

El Pir y el Nac 10 mM protegen parcialmente de la formación de peroxinitritos cuando se preincuba o no y luego se coincide con el antioxidante y el AcPb (grupos 6 y 7) (Figura 9). El Pir y el Nac no evitan (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) la formación de peroxinitrito con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 9).

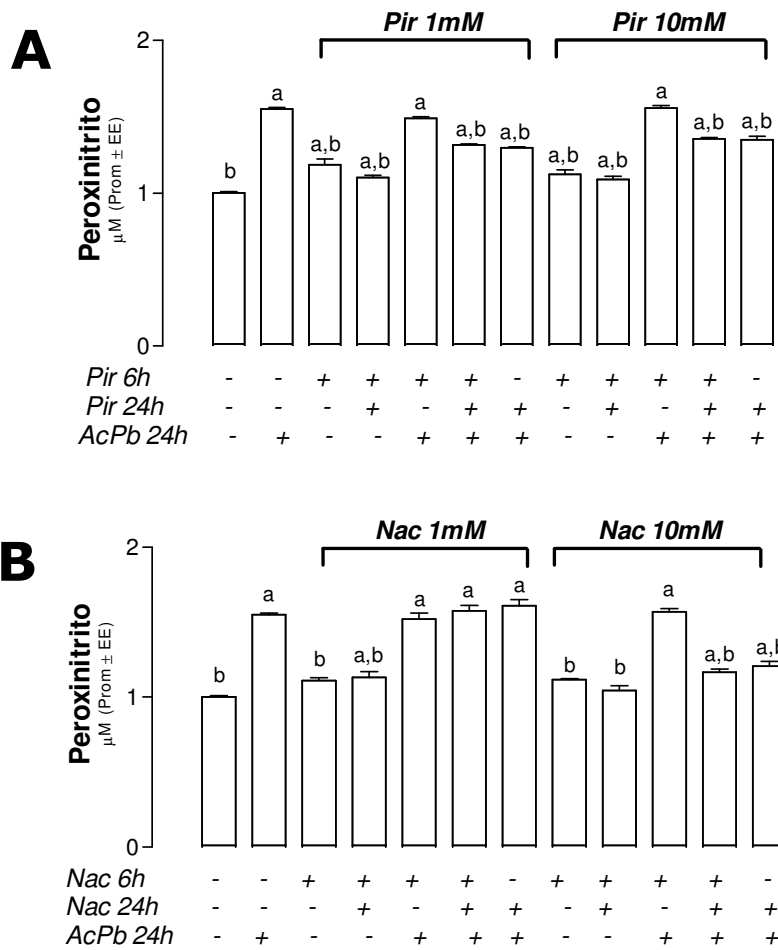


Figura 9. Efecto del Piruvato [Pir] (A) y de la N-acetil cisteína [Nac] (B) en la cantidad de peroxinitrito en la toxicidad por AcPb. Peroxinitrito [μM] (Prom \pm E.E.) n=9. ANOVA $P < 0.0001$ y pos-análisis de Bonferroni. ^a $P < 0.001$ vs grupo control, ^b $P < 0.001$ vs grupo de AcPb.

El Ebs 1 μ M, el Dmtu 2 mM y el Tem a ambas concentraciones utilizadas evitan parcialmente la formación de peroxinitrito (grupo 5 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb]) (Figuras 10 y 11). El Ebs, el Dmtu y el Tem no protegen (grupos 6 [6h de preincubación con antioxidante + 24h con AcPb y antioxidante] y 7 [24h con AcPb y antioxidante]) de la formación peroxinitrito con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figuras 10 y 11).

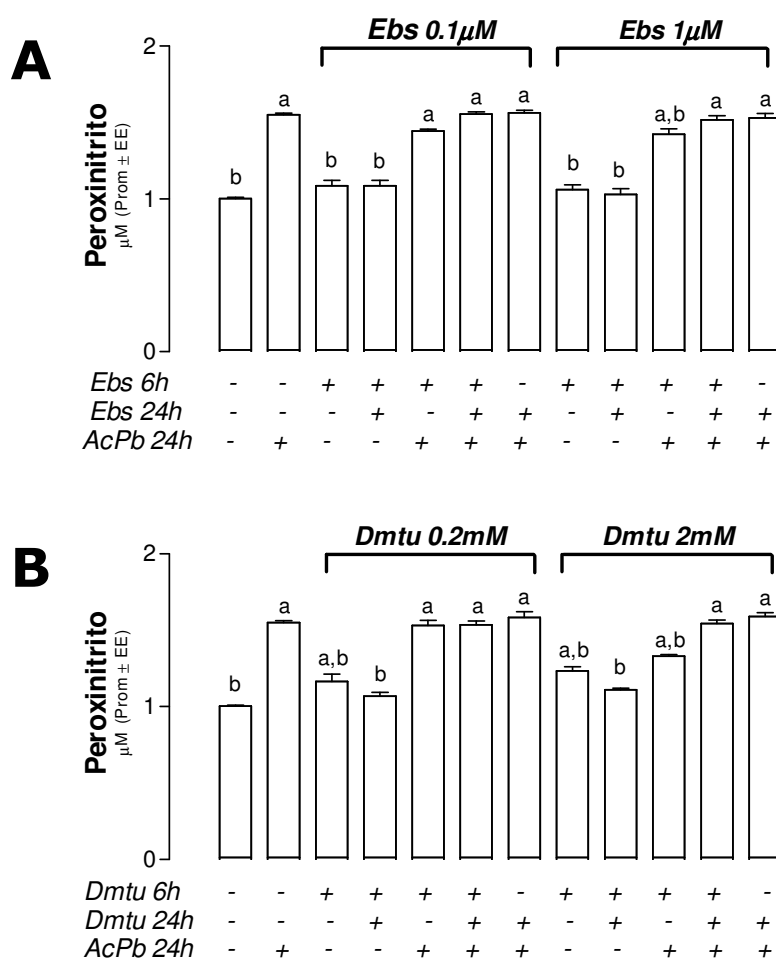


Figura 10. Efecto del Ebselan [Ebs] (A) y de la Dimetil tiourea [Dmtu] (B) en la cantidad de peroxinitrito en la toxicidad por AcPb. Peroxinitrito [μ M] (Prom \pm E.E.) n=9. ANOVA P<0.0001 y pos-análisis de Bonferroni. ^aP<0.001 vs grupo control, ^bP<0.05 vs grupo de AcPb.

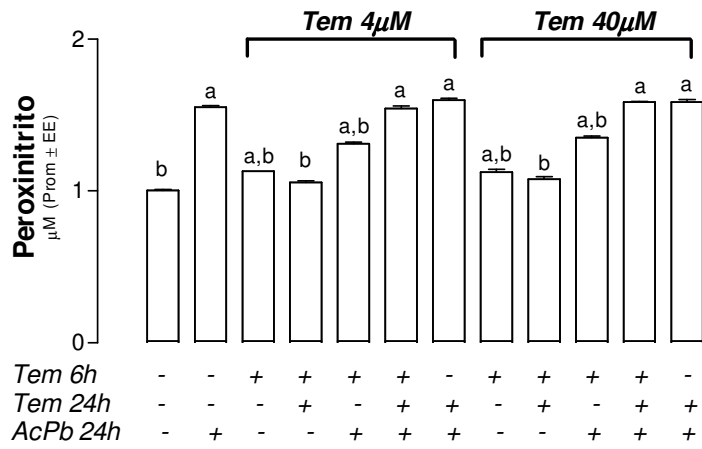


Figura 11. Efecto del Tempol [Tem] en la cantidad de peroxinitrito en la toxicidad por AcPb. Peroxinitrito [μM] (Prom \pm E.E.) n=9. ANOVA $P<0.0001$ y pos-análisis de Bonferroni. ^a $P<0.01$ vs grupo control, ^b $P<0.001$ vs grupo de AcPb.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

La solubilidad del acetato de plomo en el medio impidió que se probaran concentraciones mayores de 2 mM, por tal motivo, las curvas dosis respuestas no presentan la parte final de la curva.

El método para medir viabilidad por cristal violeta fue el que se utilizó en los ensayos con antioxidantes, debido a que presentó menores variaciones en todas las concentraciones probadas. Estas variaciones probablemente ocurran por la generación de ERO por parte del acetato de plomo, las cuales pueden reaccionar con el MTT. Se decidió utilizar una concentración de 1.5 mM de acetato de plomo que genera una toxicidad de aproximadamente 30%, es decir que la viabilidad respecto al control es del 70%.

Los antioxidantes curcumina y ácido ascórbico no generan prevención ni protección, lo cual correlaciona con la cantidad de peroxinitrito presente. Es decir, la cantidad de peroxinitrito no se modifica con respecto a la generada por el AcPb. A pesar de que estos antioxidantes pueden eliminar ERO, el hecho de no conferir protección, sugiere que se forman otros radicales derivados o no de los antioxidantes, que pueden contribuir al daño por el acetato de plomo.

Los antioxidantes s-alil cisteína y s-alil mercaptocisteína son capaces de proteger parcialmente y piruvato y n-acetil cisteína protegen totalmente a las células LLC-PK1 de la toxicidad por el acetato de plomo, pero no previenen el daño. Es decir, necesita estar presente el antioxidante para conferir un beneficio. Esto sugiere que no es suficiente el antioxidante que pueda tomar la célula durante la preincubación. El antioxidante debe estar presente para reaccionar con los radicales que se forman durante la exposición con el acetato de plomo. Esta protección corresponde con la disminución del peroxinitrito.

La protección total que observamos (utilizando piruvato y N-acetil-cisteína) indica que el estrés oxidativo es un factor importante en la toxicidad por el acetato de plomo. Además sugiere que los radicales H_2O_2 , OH^\bullet , y $O_2^{\bullet-}$ se encuentran involucrados en esta toxicidad.

Los antioxidantes Ebselen, DMTU y tempol son capaces de prevenir parcialmente la muerte de las células y la formación de peroxinitrito en la toxicidad por el acetato de plomo. Esto sugiere que la cantidad de antioxidante captada por la célula en la preincubación evita parcialmente que los radicales que se forman dañen la célula. Se ha descrito que Ebselen, DMTU y tempol son antioxidantes específicos contra H_2O_2 , OH^\bullet , y $O_2^{\bullet-}$ respectivamente. Lo cual sugiere que estos radicales se forman durante la toxicidad con acetato de plomo. Cuando las células son expuestas a 24 h adicionales con el antioxidante no produce protección, porque la coincubación del antioxidante con el acetato de plomo también es tóxica. Probablemente la preincubación de las células con una combinación estos antioxidantes pueda generar una prevención mayor.

Este estudio es importante porque existe poca información sobre la participación del estrés oxidativo y los radicales que se forman por el plomo. El efecto del plomo en riñón ha sido poco estudiado. El conocimiento sobre las características del daño que se genera y las posibilidades que existen para evitar o disminuir el daño que produce el plomo contribuirá para prevenirlo.

IX. CONCLUSIONES

Se estableció el modelo de toxicidad por acetato de plomo en células LLCPK1. La CL_{50} es de 1.2 μM por el método de reducción de MTT y de 2 μM por el método tinción con cristal violeta.

Los antioxidantes Ebselen, DMTU y tempol previenen parcialmente de la muerte celular y del estrés oxidativo por acetato de plomo en las células LLCPK1.

Los antioxidantes S-alil cisteína y S-alil mercaptocisteína protegen parcialmente de la muerte celular y del estrés oxidativo por acetato de plomo en las células LLCPK1.

Los antioxidantes piruvato y N-acetil cisteína protegen totalmente de la muerte celular y del estrés oxidativo por acetato de plomo en las células LLCPK1.

El estrés oxidativo es un factor importante en el daño generado *in vitro* por el acetato de plomo y las ERO H_2O_2 , OH^\bullet , y $\text{O}_2^{\bullet-}$ se encuentran directamente involucradas.

X. REFERENCIAS

- Adonaylo VN, Oteiza PI. 1999. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135: 77-85.
- Amagase H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr.* 136: 716S-725S.
- Antonio-Garcia MT, Lujan Masso-Gonzalez E. 2008. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: *Food and Chemical Toxicology* IN PRESS.
- Arteel GE, Briviba K, Sies H. 1999. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett* 445: 226-230.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biol Med* 6: 593–597.
- Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Jung JS, Kim YK. 2003. Diferencial roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* 142: 178-186.
- Bozena G, Andrzej M. 2006. Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors. *Pharmacol Reports* 58: 381-392.
- Cabell L, Ferguson C, Luginbill D, Kern M, Weingart A, Audesirk G. 2004. Differential induction of heme oxygenase and other stress proteins in cultured hippocampal astrocytes and neurons by inorganic lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 49-60.
- Cameron NE, Tuck Z, McCabe L, Cotter MA. 2001. Effect of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. *Diabetologia* 44: 1161-1191.
- Chung LY. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J Med Food* 9: 205–213.

- Correa M, Miquel M, Sanchis-Segura C, Aragon CM. 1999. Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity. *Alcohol* 19: 43-49.
- Daggett DA, Oberley TD, Nelson SA, Wright LS, Kornguth SE, Siegel FL. 1998. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology* 128: 191-206.
- Dairam A, Limson JL, Watkins GM, Antunes E, Daya S. 2007. Curcuminoids, Curcumin, and Demethoxycurcumin Reduce Lead-Induced Memory Deficits in Male Wistar Rats. *J Agric Food Chem* 55: 1039-1044.
- Ding Y, Gonick HC, Vaziri ND, Liang K, Wei L. 2001. Lead-induced hypertension. III. Increased hydroxyl radical production. *Am J Hypertens* 14: 169-173.
- dos Santos NAG, Martins NM, Curti C, Pires Bianchi ML, Cardozo dos Santos A. 2007. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. *Chemico-Biological Interactions* 170: 177-186.
- Ercal N, Neal R, Treeratphan P, Lutz PM, Hammond TC, Dennery PA, Spitz DR. 2000. A role for oxidative stress in suppressing serum immunoglobulin levels in lead-exposed Fisher 344 rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 251-256.
- Goyer RA. 1989. Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 46: 153-162.
- 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-L249.
- Hahn SM, Tochner Z, Murali Krishna C, Glass J, Wilson L, Samuni A, Sprague M, Venzon D, Glatstein E, Mitchell JB, Russo A. 1992. Tempol, a Stable Free Radical, Is a Novel Murine Radiation Protector¹. *Cancer Res* 52: 1750-1753.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Press, New York, USA.

- Hunaiti AA, Soud M. 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase, and peroxidase in human blood. *Sci Total Environ* 248: 45-50.
- 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, Niiya Y, Kurita H, Shima S, Sarai S. 1985. Serum lipid per-oxide level and blood superoxide dismutase activity in workers with occupational exposure to lead. *Int. Arch Occup Environ Health* 56: 119-127.
- Jung-Mi H, Byung-Joon C, Tian-Zhu L, Nong-Hoon C, Fu-Shi Q, Bong-Jun J, Ik-Hyun C, Hea-Nam H, Jong-Hwan L. 2007. Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo *Brain Res* 1185: 68-74.
- Kim M, 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.
- Lapchak PA, Zivin JA. 2003. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, is neuroprotective after embolic strokes in rabbits: synergism with low-dose tissue plasminogen activator. *Stroke* 34: 2013-2018.
- Lars-Oliver K, Sies H. 2003. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicology Lett* 140/141: 125-132.
- Lau BHS, Lam F, Wang-Cheng R. 1987. Effects of an odor-modified garlic preparation on blood lipids. *Nutr Res* 7: 139-49.
- 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.
- Manning RD Jr, Meng S, Tian N. 2003. Renal and vascular oxidative stress and salt-sensitivity of arterial pressure. *Acta Physiol Scand* 179: 243-250.

- Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2007 45: 2030–2039.
- Mesa MD, Ramírez Tortosa MC, Aguilera MC. 2000. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de curcuma longa y de los curcuminoides. *Ars Pharmaceutica* 41: 307-321.
- Muller A, Cadenas E, Graf P, Sies H. 1984. A novel biologically active seleno-organic compound-I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem Pharmacol* 33: 3235-3239.
- Nakagawa S, Kasuga S, Matsuura H. 1988. Prevention of liver damage by aged garlic extract and its constituents in mice. *Phytother Res* 1: 1-4.
- Numagami Y, Sato S, Ohnishi T. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* 29: 135-43.
- Othman AI, El Missiry MA. 1998. Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J Biochem Mol Toxicol* 12: 345-349.
- Rice-Evans CA. 1994. Formation of the free radicals and mechanisms of action in normalbiochemical processes y pathological status. In: *Free radicals and its control*. Rice Evans A.C. y Burdon R.H. Elsevier Science. USA 131-135.
- Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. 1991. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88: 1886-1893.
- Samuni A, Mitchell JB, Krishna CM, Samuni U, Russo A. 1991a. Nitroxide SOD-mimics: modes of action. *Free Rad Res Commun* 12/13: 197-194.
- Samuni A, Winkelsberg D, Pinson A, Hahn SM, Mitchell JB, Russo A. 1991b. Nitroxide stable radicals protect beating cardiomyocytes against oxidative damage. *J Clin Invest* 87: 1526-1530.

- Sarker KP, Biswas KK, Rosales JL, Yamaji K, Hashiguchi T, Lee KY, Maruyama I. 2003. Ebselen inhibits NO-induced apoptosis of differentiated PC12 cells via inhibition of ASK1-p38 MAPK-p53 and JNK signaling and activation of p44/42 MAPK and Bcl-2. *J Neurochem* 87: 1345-1353.
- Sugawara E, Nakamura K, Miyake T, Fukumura A, Seki Y. 1991. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br J Ind Med* 48: 239-242.
- Sumioka I, Matsuura T, Kasuga S, Itakura Y, Yamada K. 1998. Mechanisms of protection by S-allyl mercaptocysteine against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Jpn J Pharmacol* 78: 199-207.
- Varma SD, Hegde KR, Kovtun S. 2006. Oxidative damage to lens in culture: reversibility by pyruvate and ethyl pyruvate. *Ophthalmologica* 220: 52-57.
- Vaziri ND, Ding Y. 2001. Effect of lead on nitric oxide synthase expression in coronary endothelial cells: role of superoxide. *Hypertension* 37: 223-226.
- Witzmann FA, Fultz CD, Grant RA, Wright LS, Kornguth SE, Siegel FL. 1999. Regional protein alterations in rat kidney induced by lead exposure. *Electrophoresis* 20: 943-951.
- Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, Yasuhara H. 1998. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* 29: 12-17.