



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTO DEL EXTRACTO DE AJO
ENVEJECIDO EN LA INSUFICIENCIA RENAL
AGUDA POR MEDIO DE CONTRASTE EN
RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

QFB. MIRIAM GABRIELA CARRANZA PÉREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO

COMITÉ TUTOR: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2011



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 03 de octubre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **CARRANZA PÉREZ MIRIAM GABRIELA** con número de cuenta **401050646**, con la tesis titulada **“EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA POR MEDIO DE CONTRASTE EN RATA”**, realizada bajo la dirección del: **DRA. DIANA BARRERA OVIEDO**

Presidente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
Secretario: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
Suplente: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
Suplente: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de noviembre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la **UNAM**, por aceptarme en su programa y por el apoyo recibido durante el desarrollo de este proyecto, especialmente a todas aquellas personas que deben lidiar con nuestras dudas, prisas y distracciones.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca que me otorgó para realizar los estudios de Maestría, CVU 297720.

Al proyecto **PAPIIT UNAM IN205310** por brindarme los recursos para desarrollar esta tesis.

A los miembros del Comité Tutor:

Dra. Diana Barrera Oviedo	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Martha Franco Guevara	INC "Ignacio Chávez"
Dr. José Pedraza Chaverrí	Facultad de Química, UNAM

Por aportar a este proyecto su experiencia y conocimientos

Agradecimientos

*A **Dios** por todo lo que me ha dado y por ser quien guía mis pasos.*

*A mis **padres** y mi **hermana** por darme su amor, su apoyo y por ser mi mejor ejemplo.*

*A todos los demás seres que son la causa de mis alegrías y demás emociones, en especial a:
Evelyn, Maggie y Agustín.*

*A **Lucy Flores** por aguantar mis malos ratos y por auxiliarme en momentos de crisis.*

*A mis compañeras de laboratorio en especial a **ClauX** por aguantar mis quejas y manías.*

*A **Gaby Rodríguez** por su amistad, sus atenciones y por “enseñarnos” el mundo.*

*Al **Dr. Juan Molina** por todo el apoyo que me ha dado desde el inicio de este proyecto; así como a sus colaboradoras: **Paty, Nidia, Maribel y Sra. Mati.***

*A **Juanita y Amelia** por los consejos, la ayuda y su amabilidad en todo momento.*

*A **Erika Rodríguez** por apoyarme desde el primer trámite, por su disposición y amabilidad.*

*A la **Dra. Perla Maldonado** por proporcionarme la SAC y su asesoría.*

*A los colaboradores del **Dr. Pedraza** por las atenciones y la ayuda para realizar este trabajo, en especial al **Mtro. Omar Medina** por su asesoría y disposición todo el tiempo.*

*A los colaboradores de la **Dra. Franco** por enseñarme a administrar el medio de contraste.*

A los doctores que me dieron clase por compartir sus conocimientos.

A todas las personas que compartieron su tiempo conmigo ayudándome a estudiar, dándome tips o teniendo una actitud cordial en el día a día.

*A la **Dra. Diana Barrera** por dirigir este trabajo y por fomentar mi desarrollo profesional.*

*A la **UNAM** por ser parte fundamental en mi educación, por todos los recursos que pone a nuestro alcance y por ser mi segundo hábitat.*

*Al **CONACYT** por haberme otorgado una beca para continuar mi desarrollo académico.*

ÍNDICE

Índice de figuras	viii
Índice de tablas	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
I. Introducción	1
II. Objetivo general	4
III. Objetivos particulares	4
IV. Hipótesis	4
V. Antecedentes	5
1. Riñón	5
1.1. Anatomía externa del riñón	5
1.2. Anatomía interna del riñón	6
1.3. Nefrona	6
1.3.1 Corpúsculo renal	7
1.3.2. Túbulo contorneado proximal	8
1.3.3. Asa de Henle	9
1.3.4. Túbulo contorneado distal	10
1.4. Nefropatías	11
1.4.1. Insuficiencia renal aguda (IRA)	12
1.4.1.1. IRA intrarrenal causada por anomalías dentro del riñón	13
2. Medios de contraste	14
2.1. MD-76R™	16
2.2. IRA causada por medio de contraste (IRA-MC)	17
2.2.1. Medidas para evitar la IRA-MC	19
3. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y de Nitrógeno (ERN)	21
3.1. Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	23
3.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	24
3.3. Radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$)	25
3.4. Otras especies reactivas	25
4. Estrés oxidante	26
5. Antioxidantes	27
5.1. Enzimas antioxidantes	27
5.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)	27
5.1.2. Glutación peroxidasa (GPx)	29
5.1.3. Catalasa (CAT)	31
5.1.4. Hemo oxigenasa (HO)	32
5.2. Antioxidantes no enzimáticos	32
5.2.1. Glutación (GSH)	33
5.2.2. Ácido ascórbico	33
5.2.3. α -Tocoferol	34
5.2.4. Ajo	35
5.2.4.1. Química del ajo	36
5.2.4.2. Efectos benéficos del ajo	38
5.2.4.3. Efectos adversos del ajo	39

5.2.4.4. Preparaciones de ajo	40
5.2.4.5. Extracto de ajo envejecido (EAE)	40
5.2.4.5.1. Componentes del EAE	41
5.2.4.5.2. EAE como antioxidante	42
5.2.4.5.3. Seguridad del EAE	44
5.2.4.6. S-alil-L-cisteina. (SAC)	45
VI. Materiales y métodos	46
1. Animales	46
2. Diseño experimental	46
2.1. Modelo de IRA-MC en ratas	46
2.2. Efecto del EAE en el modelo de IRA-MC	47
2.3. Efecto del SAC en el modelo de IRA-MC	47
3. Muestras	47
3.1. Suero	47
3.2. Riñón	47
3.3. Homogenado para determinaciones enzimáticas	47
3.4. Cuantificación de proteínas	48
3.5. Cortes histológicos	48
4. Evaluación del daño renal	48
4.1. Función glomerular	48
4.1.1. Creatinina en suero (SCr)	48
4.1.2. Nitrógeno de urea en el suero sanguíneo (BUN)	49
4.2. Daño tubular	50
4.2.1. Actividad de la enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa NAG en homogenado	50
4.2.2. Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)	50
4.2.3. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)	51
4.2.4. Análisis histológico	51
5. Evaluación del estrés oxidante	52
5.1. Contenido de carbonilos en proteínas	52
6. Evaluación de la expresión de las enzimas antioxidantes en el riñón	53
6.1. Actividad de enzimas	53
6.1.1. Actividad de la SOD total	53
6.1.2. Actividad de la CAT	53
6.1.3. Actividad de la GPx	54
6.2. Cuantificación de enzimas	54
6.2.1. Inmuno ensayo tipo “western blot”	54
7. Materiales	55
8. Análisis estadístico	56
VII. Resultados	56
1. Modelo de IRA-MC en ratas	56
1.1. Sensibilización de la función renal	56
1.2. Efecto de la administración de diatrizoato a ratas con función renal sensibilizada	58
2. Efecto del EAE en el modelo de IRA-DIA	58
3. Efecto de la SAC en el modelo de IRA-DIA	58
4. Efecto del EAE y la SAC en ratas con función renal sensibilizada	62

5. Efecto del EAE y la SAC en ratas sanas	63
6. Evaluación de daño tubular	64
6.1. Actividad de NAG en homogenado renal	64
6.2. Actividad de LDH en suero	64
6.3. Análisis histológico	67
7. Evaluación del estrés oxidante	71
7.1. Contenido de carbonilos en homogenado renal	71
8. Determinación de enzimas antioxidantes	73
8.1. Actividad de SOD total en homogenado renal	73
8.2. Actividad de CAT en homogenado renal	75
8.3. Actividad de GPx en homogenado renal	75
8.4. Contenido de CuZn-SOD en homogenado renal	77
8.5. Contenido de Mn-SOD en homogenado renal	80
8.6. Contenido de CAT en homogenado renal	80
8.7. Contenido de HO-1 en homogenado renal	83
VIII. Discusión	85
IX. Conclusiones	91
X. Referencias	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sección del riñón humano que muestra las principales estructuras anatómicas	6
Figura 2. Ultraestructura celular y características del transporte primario del túbulo proximal	9
Figura 3. Ultraestructura celular y características del transporte en el asa de Henle	9
Figura 4. Ultraestructura celular y características del transporte del túbulo distal y del túbulo colector	11
Figura 5. Estructura de diatrizoato meglumina y de diatrizoato de sodio	16
Figura 6. Propuesta de la fisiopatología de la IRA-MC	18
Figura 7. <i>Allium sativum</i> L.	35
Figura 8. Cambios químicos en el ajo	37
Figura 9. Establecimiento del modelo de sensibilización del riñón con indometacina y L-NAME	57
Figura 10. Establecimiento de daño con diatrizoato en ratas sensibilizadas con indometacina y L-NAME	59
Figura 11. Evaluación del efecto del EAE en el modelo de IRA-DIA	60
Figura 12. Evaluación del efecto de la SAC en el modelo de IRA-DIA	61
Figura 13. Evaluación del efecto del EAE y de la SAC en ratas inyectadas con indometacina y L-NAME	62
Figura 14. Evaluación del efecto del EAE y de la SAC en ratas sanas	63
Figura 15. Evaluación de la actividad de NAG en homogenado de riñón	65
Figura 16. Evaluación de la actividad de LDH en suero	66
Figura 17. Estudio histológico de la corteza	68
Figura 18. Estudio histológico de la médula externa	69
Figura 19. Cuantificación de signos de daño	70
Figura 20. Evaluación del contenido de proteínas oxidadas en homogenado de riñón	72

Figura 21. Evaluación de la actividad de SOD en homogenado de riñón	74
Figura 22. Evaluación de la actividad de CAT en homogenado de riñón	76
Figura 23. Evaluación de la actividad de GPx en homogenado de riñón	78
Figura 24. Contenido de CuZn-SOD en homogenado de riñón	79
Figura 25. Contenido de Mn-SOD en homogenado de riñón	81
Figura 26. Contenido de CAT en homogenado de riñón	82
Figura 27. Contenido de HO-1 en homogenado de riñón	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras químicas de los medios de contraste	15
Tabla 2. Especies oxidantes reactivas de mayor importancia biológica	22
Tabla 3. Actividades biológicas del ajo	39
Tabla 4. Productos de ajo disponibles comercialmente	41
Tabla 5. Algunas de las actividades biológicas de EAE y sus componentes	42

ABREVIATURAS

•OH – radical hidroxilo

AINEs – anti-inflamatorios no esteroideos

BUN – nitrógeno de urea en sangre

CAT – catalasa

CO – monóxido de carbono

cP – centipoise

Cu – cobre

CuZn-SOD – superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

DADS – dialildisulfuros

DAS – dialilsulfuros

DIA - diatrizoato

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

EAE – extracto de ajo envejecido

EC-SOD – superóxido dismutasa extracelular

ERN – especies reactivas de nitrógeno

ERO – especies reactivas de oxígeno

Fe – hierro

GPx – glutatión peroxidasa

GSH – glutatión reducido

H&E – hematoxilina y eosina

H₂O₂ – peróxido de hidrógeno

HCl – ácido clorhídrico

HO – hemo oxigenasa

I-L – indometacina y L-NAME

IRA – insuficiencia renal aguda

IRA-DIA – insuficiencia renal aguda causada por diatrizoato

IRA-MC – insuficiencia renal aguda causada por medio de contraste

kDa – kilodaltones

LDH – lactato deshidrogenasa

L-NAME – N^o-nitro-L-arginina metil ester

MCAO – medio de contraste de alta osmolaridad

MCBO – medio de contraste de baja osmolaridad

MCIO – medio de contraste isoosmolar

Mn-SOD – superóxido dismutasa dependiente de manganeso

NAC – N-acetilcisteína

NaCl – cloruro de sodio

NADH – nicotinamida adenina dinucleótido

NAG – N-acetil-β-D-glucosaminidasa

NBT – nitroazul de tetrazolio

NO[•] – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintasa

O₂^{•-} - anión superóxido

PAECs – células endoteliales de arteria pulmonar bovina

SAC – S-alil-L-cisteína

SAMC – S-alilmercaptocisteína

SCr – creatinina en suero

Se – selenio

SOD – superóxido dismutasa

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

VFG – velocidad de filtración glomerular

Zn – zinc

RESUMEN

Los estudios indican que el estrés oxidante se encuentra entre los mecanismos que producen la insuficiencia renal aguda causada por medio de contraste (IRA-MC). Aunque no hay un tratamiento específico para evitarla, se han utilizado algunos antioxidantes, pero los resultados no son concluyentes.

El ajo (*Allium sativum L.*) se ha utilizado tradicionalmente como condimento y remedio para diferentes afecciones. El extracto de ajo envejecido (EAE) es una preparación que presenta olor suave y alto contenido de antioxidantes. La S-alil-L-cisteína (SAC) está presente en el ajo y su concentración es elevada en el EAE porque aumenta en el proceso de envejecimiento. Se ha demostrado que la SAC es un buen antioxidante.

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho. El modelo de IRA-MC se estableció administrando indometacina, L-NAME y diatrizoato a intervalos de 15 min, utilizando diferentes dosis. Se evaluó el efecto del EAE (a las dosis de 0.5, 1, 1.2, 1.5 y 2 ml/kg i.p) y de la SAC (a las dosis de 200, 300, 400 y 500 mg/kg i.p.) administrados 30 min antes que el modelo de IRA-MC (13 mg/kg indometacina +13 mg/kg L-NAME+4 g iodo/kg diatrizoato i.v.).

Los animales se sacrificaron 24 horas después del tratamiento. Se determinó el nitrógeno de urea en sangre (BUN) y creatinina en suero (SCr). En homogenado de riñón se evaluó la actividad de las enzimas: N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), lactato deshidrogenasa (LDH), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). También, se determinó el contenido de carbonilos.

Se encontró que tanto el EAE (a las dosis de 1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg) así como la SAC (a las dosis de 300, 400 y 500 mg/kg) protegen del daño renal y oxidante a las ratas Wistar administradas con el modelo de IRA-MC. Y que el modelo de IRA-MC modifica la expresión de las enzimas antioxidantes e induce a la hemo oxigenasa 1 (HO-1).

ABSTRACT

Studies indicate that oxidative stress is among the mechanisms responsible for acute renal failure caused by contrast media (ARF-CM). Although there is no specific treatment to prevent it, some antioxidants have been used, but results are inconclusive.

Garlic (*Allium sativum L.*) has been used traditionally as a condiment and a remedy for various ailments. Aged garlic extract (AGE) is a preparation that has mild odor and high antioxidant content. The S-allyl-L-cysteine (SAC) is present in garlic and its concentration is elevated in AGE because it increases in the aging process. It has been shown that the SAC is a good antioxidant.

In this work we used male Wistar rats. The ARF-CM model was established by administration indomethacin, L-NAME and diatrizoate at intervals of 15 min, using different doses. We evaluated the effect of AGE (at doses of 0.5, 1, 1.2, 1.5 and 2.0 ml/kg i.p.) and SAC (at doses of 200, 300, 400 and 500 mg/kg i.p.) administered 30 min before the ARF-CM model (13 mg/kg indomethacin+13 mg/kg L-NAME+4 g iodine/kg diatrizoate i.v.).

The animals were sacrificed 24 hours after treatment. We determined the blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr). In kidney homogenate was assessed the activity of enzymes: N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), lactate dehydrogenase (LDH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). We also determined the content of carbonyls.

We found that both the AGE (at doses of 1.2, 1.5 and 2.0 ml/kg) and the SAC (at doses of 300, 400 and 500 mg/kg) protect against kidney and oxidative damage to Wistar rats administered with the ARF-CM model. And that this model modifies the expression of antioxidant enzymes and induces heme oxygenase 1 (HO-1).

I. INTRODUCCIÓN

En el año 2003 se administraron más de 80 millones de dosis de medio de contraste iodado (8 millones de litros) por vía intravenosa en el mundo, por lo que el medio de contraste constituye uno de los fármacos más utilizados en la actualidad. En países desarrollados, como EUA, Japón y los de Europa, menos del 10% del volumen administrado corresponde a los medios de contraste iónicos, mientras que en países en vías de desarrollo, como China o algunos países latinoamericanos, la proporción aumenta al 40 y 60%, respectivamente, relacionándose de forma significativa con la situación económica del país (Fraile y García, 2008).

La administración de medio de contraste es de gran importancia en muchos procedimientos de diagnóstico; sin embargo, puede traer efectos adversos en un pequeño porcentaje de pacientes (Schröder, 2005) a pesar del uso de medios de contraste nuevos y menos nefrotóxicos (Goldenberg y Matetzky, 2005). La nefrotoxicidad secundaria a la administración de medio de contraste iodado representa la tercera causa de insuficiencia renal aguda (IRA) en pacientes hospitalizados (aproximadamente el 10%) (Erley, 2007; Goldenberg y Matetzky, 2005; McCullough et al., 2006a; Sanaei-Ardekani et al., 2005; Toprak, 2007). La IRA causada por medio de contraste (IRA-MC) es un problema clínico común que crece en importancia conforme se incrementa el número de pruebas y procedimientos realizados con medio de contraste. La mortalidad asociada a la IRA tóxica es de aproximadamente el 30%. La IRA-MC no sólo aumenta el riesgo de muerte por falla renal, sino que también se ha asociado a una mayor morbilidad e incluso a una mayor mortalidad por sepsis, hemorragia, coma o insuficiencia respiratoria (Fraile y García, 2008).

Los principales factores de riesgo para que se presente la IRA-MC son: falla renal, diabetes mellitus, edad avanzada, administración de fármacos nefrotóxicos, hipovolemia, falla cardíaca congestiva, el uso de grandes cantidades de medio de contraste o de un medio de contraste hiperosmolar (Bagshaw y Culleton, 2006; Erley, 2007; Liu et al., 2005) e hipercolesterolemia (Yang et al., 2004).

Recientemente, se han asociado como factores de riesgo: el síndrome metabólico, la hiperuricemia y la alteración en el metabolismo de la glucosa, así como el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I y los bloqueadores del receptor II de angiotensina (Toprak, 2007).

La nefrotoxicidad asociada a los medios de contraste parece ser el resultado de la toxicidad directa en células del epitelio de los túbulos renales e isquemia en la médula renal. Además, un mecanismo clave parece ser la alteración en la hemodinámica renal (Giannattasio, 2005; Goldenberg y Matetzky, 2005; Oudemans-van Straaten, 2005; Pucelikova et al., 2008), probablemente causada por desbalances entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, debido a cambios en la biodisponibilidad de: el óxido nítrico (NO^{*}), las prostaglandinas, la endotelina y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Briguori et al., 2005; Liu et al., 2005; Malyszko, 2010; Toprak et al., 2008).

Para evitar la IRA-MC se practican estrategias que incluyen la identificación correcta de pacientes de alto riesgo (Toprak, 2007), la evaluación de otros métodos de diagnóstico, la aplicación de medio de contraste de baja osmolaridad en la dosis mínima aceptable, suspender la administración de fármacos nefrotóxicos e hidratar con NaCl o bicarbonato de sodio (Venkataraman, 2008). También se han empleado antagonistas de canales de calcio, antagonistas de los receptores de endotelina y dopamina (Asif et al., 2005) y antagonistas de la adenosina (Erley, 2007; Giannattasio, 2005; Oudemans-van Straaten, 2005). Recientemente, se han empleado algunos antioxidantes como: el selenio (Se) (Joannidis, 2007), el ácido ascórbico (Spargias et al., 2004) y la N-acetil-cisteína (NAC) (Fishbane, 2008; Pannu et al., 2004; Tepel et al., 2000; Yenicerioglu et al., 2006). Estos dos últimos son ligeramente efectivos en la prevención de IRA-MC, lo cual sugiere que el estrés oxidante, más que la reducción en el flujo sanguíneo, juega un papel importante en el desarrollo de la IRA-MC (Itoh et al., 2005).

Estudios realizados en humanos y en animales demostraron que la IRA-MC es acompañada por el aumento en la producción de ERO (Bakris et al., 1990; Goldenberg y Matetzky, 2005; Tepel, 2003). Yoshioka y sus colaboradores (1992)

encontraron un aumento en los productos de lipoperoxidación en ratas deshidratadas y administradas con diatrizoato (DIA). Esto fue confirmado por Toprak y sus colaboradores (2008) quienes, además, encontraron un aumento de los carbonilos en suero. Por otro lado, Lee y sus colaboradores (2006) observaron que la administración de DIA suprimió la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en ratas normales y en ratas diabéticas. Estos resultados fueron apoyados por Yen y sus colaboradores (2007) cuando observaron que las ratas se pre-trataban con acetilcisteína o probucol no sufrían cambios en la actividad de GPx.

Las propiedades del ajo se han reconocido desde la antigüedad, el extracto de ajo envejecido (EAE) posee la mayoría de esas propiedades pero con un olor agradable. Estudios con el EAE y la S-alil-L-cisteína (SAC) han demostrado un amplio rango de actividades, entre ellas la antioxidante. Horie y sus colaboradores (1989) demostraron que el EAE protege a las membranas de la lipoperoxidación y sirve para mantener la fluidez de la membrana. Además, Ide y sus colaboradores (1997) encontraron que el EAE y la SAC previenen significativamente el daño en la membrana, la pérdida de la viabilidad celular y lipoperoxidación en células endoteliales de arteria pulmonar bovina (PAECs) expuestas a LDL oxidadas. Mientras que Wei y Lau (1998) y Yamasaki y Lau (1997) observaron que el EAE suprime la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), aumenta significativamente las actividades de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y GPx en PAECs. El EAE y la SAC, también, inhibieron la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) y la lipoperoxidación inducida por H_2O_2 . Los experimentos de Geng y Lau (1997) demostraron que el EAE aumenta los niveles de glutatión intracelular, y la actividad de la glutatión reductasa y la SOD en PAECs. Lo anterior sugiere que el efecto antioxidante del EAE puede atribuirse a su modulación del ciclo redox del glutatión y de la actividad de la SOD en células del endotelio vascular.

Ya que los modelos de IRA-MC requieren de la inducción de los factores de predisposición, se han mimetizando los escenarios clínicos que llevan a la IRA-MC en individuos de alto riesgo (Heyman et al. ,2008). La inhibición de prostanoides y

de NO^{*} (con indometacina y L-NAME, respectivamente) predispone a las ratas a los efectos nefrotóxicos del medio de contraste, y se han propuesto como un modelo experimental relevante (Itoh et al., 2005; Pollock et al., 1997; Touati et al., 1993). Por lo que utilizamos este modelo para estudiar el efecto del EAE y la SAC.

II. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del EAE en la IRA-MC en un modelo experimental en rata.

III. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Establecer el modelo de IRA-MC en ratas.
- 2.- Establecer un modelo de protección con EAE en la IRA-MC en ratas.
 - 2.1.- Determinar el daño funcional y estructural renal como indicadores de la presencia de la IRA-MC.
 - 2.2.- Medir la actividad renal de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y HO-1.
- 3.- Evaluar el efecto de la SAC en la IRA-MC en ratas.

IV. HIPÓTESIS

- Si en la IRA-MC está involucrado el estrés oxidante y conociendo las propiedades antioxidantes del ajo, entonces el EAE y SAC disminuirán el daño ocasionado por el medio de contraste en ratas.

V. ANTECEDENTES

1. RIÑÓN

El riñón es un órgano par y se localiza en la parte posterior del abdomen, a ambos lados de la columna vertebral (Brenner, 2005). Se encuentra entre la última vértebra torácica y la tercera vértebra lumbar, protegido en parte por los pares de costillas undécimo y duodécimo (Tortora y Reynolds, 2006).

1.1. ANATOMÍA EXTERNA DEL RIÑÓN

En el adulto, un riñón normal mide de 10-12 cm de longitud, de 5-7 cm de ancho y 3 cm de grosor. Su masa oscila entre 125-170 g en el hombre adulto, y entre 115-155 g en la mujer. El borde medial cóncavo de cada riñón está enfrente de la columna vertebral. Cerca del centro del borde cóncavo se encuentra una fisura vertical profunda llamada hilio renal a través del cual sale el uréter del riñón, así como los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y los nervios (Fig. 1).

Cada riñón está protegido por tres capas de tejido. La capa profunda, **cápsula renal**, es una membrana lisa, transparente y fibrosa que es continuación de la cubierta externa del uréter. Sirve de barrera contra traumatismos y ayuda a mantener la forma del riñón. La capa intermedia, **cápsula adiposa**, es una masa de tejido graso que rodea a la cápsula renal. También protege al riñón de traumatismos y lo sostiene firmemente en su sitio en la cavidad abdominal. La capa superficial, **aponeurosis renal**, es una delgada capa de tejido conectivo denso e irregular que fija el riñón a las estructuras circundantes y a la pared abdominal.

1.2. ANATOMÍA INTERNA DEL RIÑÓN

Un corte longitudinal del riñón revela dos regiones distintas: un área externa de color rojizo y textura lisa, **corteza renal**, y una región interna de color marrón, **médula renal** (Fig 1). En el humano, la médula consta de 8-18 pirámides renales cónicas. A diferencia del humano, la rata y otros animales de experimentación poseen una sola pirámide renal. La base de cada pirámide está frente a la corteza renal y su extremo más estrecho, llamado papila renal, apunta hacia el centro del riñón. La corteza renal del humano tiene un grosor aproximado de 1 cm, recubre la

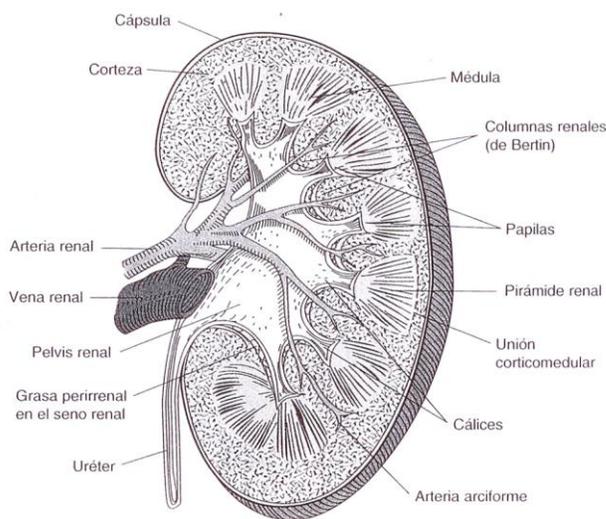


Figura 1. Sección del riñón humano que muestra las principales estructuras anatómicas.

base de cada pirámide renal y desciende entre ellas para constituir las columnas renales de Bertin (Fig. 1) (Brenner, 2005; Tortora y Reynolds, 2006).

La corteza renal y las pirámides de la médula renal constituyen la porción funcional o parénquima del riñón. En éste se encuentran alrededor de un millón de estructuras microscópicas llamadas nefronas (Tortora y Reynolds, 2006).

1.3. NEFRONA

La nefrona es la unidad funcional del riñón. Cada riñón humano contiene 400,000-1'200,000 nefronas, mientras que el riñón de rata adulta contiene de 30,000-34,000 nefronas (Brenner, 2005). Las nefronas se encargan de: filtrar la sangre, retornar a la sangre las sustancias útiles para que no se pierdan del cuerpo y retirar de la sangre sustancias que no son necesarias para el cuerpo. Mantienen la homeostasis de la sangre y producen orina.

La orina formada por las nefronas drena al interior de gruesos conductos papilares que se extienden a través de la papila renal de las pirámides. Los conductos papilares desembocan en estructuras en forma de copa llamadas cálices menores y mayores. Cada riñón tiene 8-18 cálices menores y 2-3 mayores. Los primeros reciben la orina de los conductos papilares de una papila renal y la llevan a un cáliz mayor. Luego, la orina pasa a una cavidad grande llamada pelvis renal y luego sale a través del uréter hacia la vejiga urinaria (Tortora y Reynolds, 2006).

Los componentes esenciales de la nefrona son el corpúsculo renal o de Malpighi (conformado por el glomérulo y la cápsula de Bowman), el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector (Brenner, 2005).

1.3.1. CORPÚSCULO RENAL

Los glomérulos miden alrededor de 200 μm de diámetro en el humano y 120 μm en el riñón de rata (Brenner, 2005), se forman por la invaginación de un mechón de capilares hacia el extremo ciego dilatado de la nefrona (cápsula de Bowman). Los capilares están alimentados por una arteriola aferente y drenan por una arteriola eferente un poco más pequeña. Hay dos capas celulares que separan la sangre del filtrado glomerular en la cápsula de Bowman: el endotelio capilar y el epitelio especializado de la cápsula que está formado por podocitos que cubren los capilares glomerulares. Existen células estrelladas llamadas células mesangiales que se localizan entre la lámina basal y el endotelio. Las células mesangiales son contráctiles y participan en la regulación de la filtración glomerular, secretan varias sustancias, captan complejos inmunitarios y participan en el desarrollo de enfermedades glomerulares.

El endotelio de los capilares glomerulares es fenestrado, con poros de 70 a 90 nm de diámetro. Las células del epitelio (podocitos) exhiben muchos pseudópodos que se entrelazan para formar hendiduras de filtración a lo largo de la pared capilar. Las hendiduras miden aproximadamente 25 nm de ancho y cada una está

cerrada por una membrana delgada. La lámina basal no contiene hendiduras ni poros visibles.

La membrana glomerular permite el paso libre de las sustancias neutras de hasta 4 nm de diámetro y excluye a aquellas de más de 8 nm. Las cargas de las moléculas afectan su paso hacia la cápsula de Bowman tanto como su diámetro. El área total del endotelio capilar glomerular a través del cual debe producirse la filtración en los humanos es de 0.8 m².

1.3.2. TÚBULO CONTORNEADO PROXIMAL

El túbulo contorneado proximal, en el humano, mide alrededor de 15 mm de largo y 55 µm de diámetro. Su pared está formada por una sola capa de células en forma de cubo y ricas en mitocondrias (Pocock y Richards, 2005) que se entrelazan unas con otras y están unidas por uniones apicales cerradas. Entre las bases de las células hay extensiones del espacio extracelular llamadas espacios intercelulares laterales. Los bordes luminales de las células tienen un borde de cepillo estriado por la presencia de innumerables microvellosidades (Ganong, 2006).

El túbulo proximal reabsorbe aproximadamente dos terceras partes del agua, sodio, potasio, cloro, bicarbonato y otros solutos filtrados. En circunstancias normales reabsorbe virtualmente toda la glucosa, el lactato y los aminoácidos filtrados (Fig. 2). La fuerza que impulsa la reabsorción de todas estas sustancias es la bomba de sodio (Na⁺/K⁺-ATPasa) que se halla en la superficie basolateral de las células epiteliales del túbulo proximal.

Además de su actividad reabsorbente, las células del túbulo proximal secretan activamente diversas sustancias al interior de la luz tubular. Eliminan numerosos metabolitos de la sangre, incluyendo sales biliares, creatina, hipuratos, prostaglandinas y urato. También eliminan sustancias extrañas incluyendo fármacos como penicilina, quinina y salicilatos.

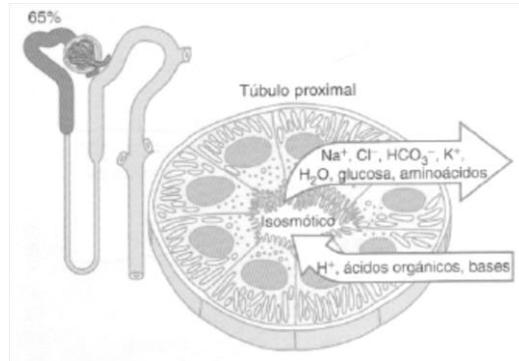


Figura 2. Ultraestructura celular y características del transporte primario del túbulo proximal.

1.3.3. ASA DE HENLE

El túbulo contorneado proximal se endereza y la siguiente porción de cada nefrona es el asa de Henle. La porción descendente del asa y la porción proximal del miembro ascendente están hechas de células delgadas, permeables. La porción gruesa del miembro ascendente está hecha de células gruesas que contienen muchas mitocondrias (Fig. 3). Las nefronas cuyos glomérulos están en las porciones externas de la corteza renal presentan asas de Henle cortas (nefronas corticales) y aquellas cuyos glomérulos están en la región yuxtamedular de la corteza (nefronas yuxtamedulares) tienen asas largas que se extienden hasta las

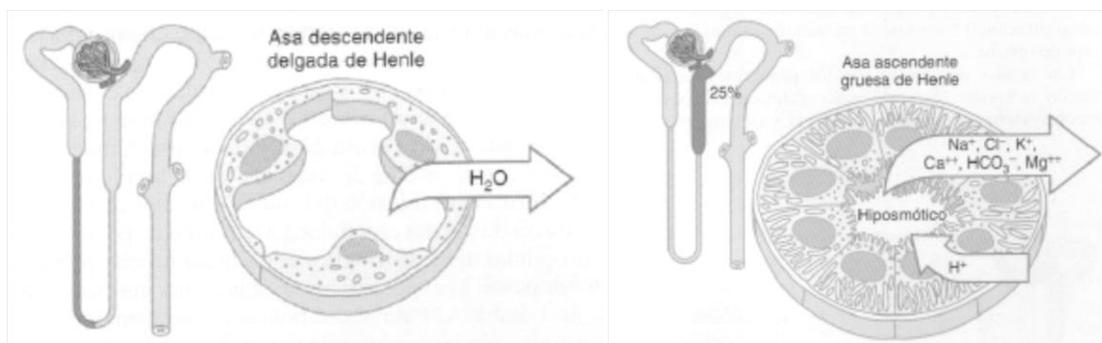


Figura 3. Ultraestructura celular y características del transporte en la rama descendente delgada del asa de Henle (izquierda) y el segmento ascendente grueso del asa de Henle (derecha).

pirámides medulares. En los humanos, sólo 15% de las nefronas tiene las asas largas.

La rama ascendente gruesa del asa de Henle llega al glomérulo de la nefrona, del cual surgió el túbulo, y pasa cerca de sus arteriolas aferente y eferente. Las células especializadas en el extremo forman la mácula densa, que está cerca de la arteriola eferente y en particular de la aferente. La mácula, las células del encaje (lakis) vecinas y las células yuxtglomerulares forman el aparato yuxtglomerular (Ganong, 2006). Éste desempeña un papel importante en la regulación del balance del sodio pues las células yuxtglomerulares secretan *renina* que interviene en la regulación de secreción de aldosterona por parte de la corteza suprarrenal (Pocock y Richards, 2005).

1.3.4. TÚBULO CONTORNEADO DISTAL

El túbulo contorneado distal, que empieza en la mácula densa, mide cerca de 5 mm de largo. Su epitelio es más bajo que el del túbulo proximal y, aunque tiene unas cuantas microvellosidades, no hay un borde de cepillo distintivo (Fig. 4A). Los túbulos distales confluyen para formar **túbulos colectores** que miden 20 mm de largo y pasan por la corteza y médula renal para vaciarse en la pelvis renal en los vértices de las pirámides medulares. El epitelio de los conductos colectores está formado por células principales (células P) y células intercaladas (células I). Las células P, que son las predominantes, son relativamente altas y tienen pocos organelos (Fig. 4B). Participan en la reabsorción de sodio y en la reabsorción de agua estimulada por vasopresina. Las células I, que se encuentran en menores cantidades y también se localizan en los túbulos distales, muestran más microvellosidades, vesículas citoplásmicas y mitocondrias. Participan en la secreción de ácido y en el transporte de bicarbonato. La longitud total de las nefronas, incluidos los túbulos colectores, varía de 45-65 mm (Ganong, 2006).

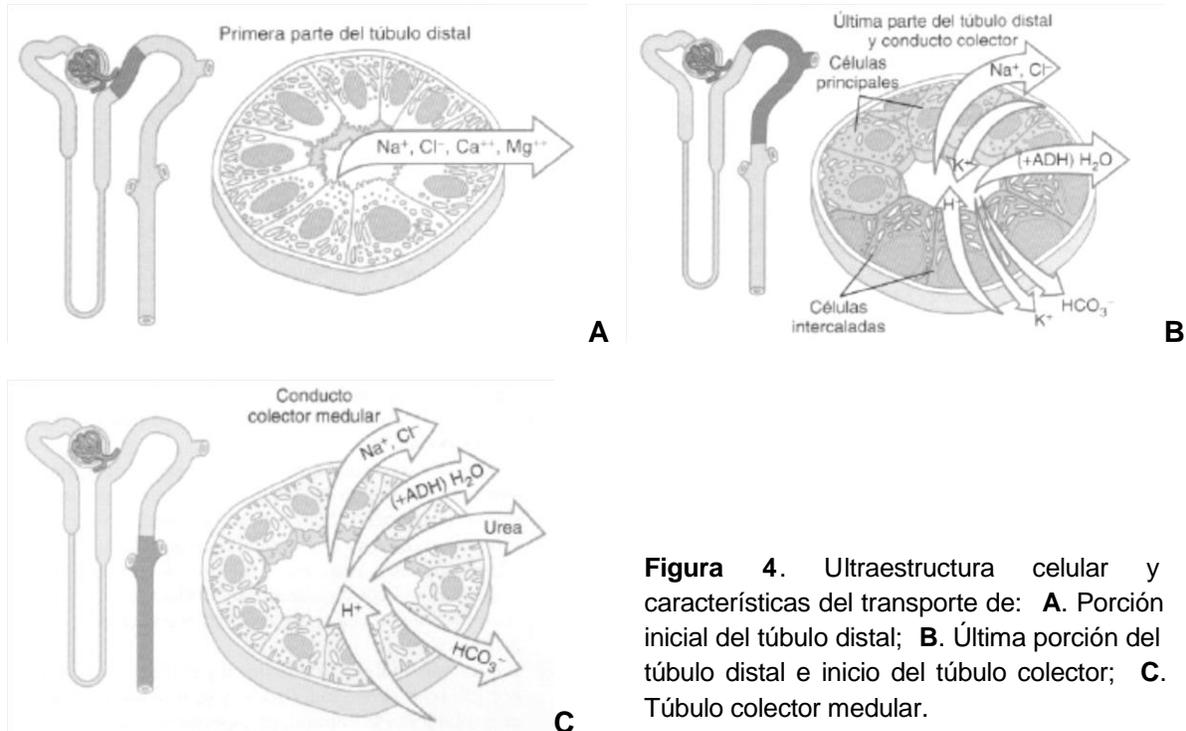


Figura 4. Ultraestructura celular y características del transporte de: **A.** Porción inicial del túbulo distal; **B.** Última porción del túbulo distal e inicio del túbulo colector; **C.** Túbulo colector medular.

1.4. NEFROPATIAS

El término nefropatía se refiere a cualquier lesión o enfermedad del riñón. Las nefropatías se encuentran entre las causas más importantes de muerte e incapacidad en muchos países de todo el mundo. Entre ellas, las producidas por la diabetes mellitus y por la hipertensión arterial, las cuales son la causa más importante de lesión renal.

La clasificación de las nefropatías se basa en varios criterios, de mayor a menor importancia. En primer lugar, se considera la estructura renal afectada: glomérulo, intersticio, túbulos o vasos. El segundo criterio para su clasificación depende de si su aparición y evolución previsible tienen un curso agudo o crónico. Finalmente, un tercer criterio es que tengan una causa o etiología desconocida (en cuyo caso se denominan **primarias** o ideopáticas), o que tengan una etiología conocida, al menos, que la nefropatía forme parte de una enfermedad más general (en cuyo caso se denominan **secundarias**). Un grupo intermedio son las nefropatías

hereditarias, ya que hasta ahora no tenían una etiología conocida y solían incluirse dentro de las primarias.

Clásicamente se distinguen tres grupos de nefropatías primarias según el componente del tejido renal afectado predominantemente: 1) nefropatías predominantemente glomerulares o glomerulopatías primarias, en que los glomérulos tienen el daño morfológico predominante y más característico; 2) predominantemente intersticiales y 3) predominantemente tubulares, en que la lesión se presenta especialmente en los epitelios tubulares. En la actualidad se tiende a reunir los dos últimos grupos en uno solo: las enfermedades túbulo-intersticiales (Botella, 2002).

Las nefropatías graves pueden dividirse en: **insuficiencia renal aguda (IRA)**, en la que los riñones dejan de funcionar de manera abrupta, pero después pueden recuperarse totalmente, y la que se produce una pérdida progresiva de la función de las nefronas, lo que reduce la función global del riñón que lleva a **insuficiencia renal crónica**. Dentro de estas dos categorías hay nefropatías específicas que pueden afectar a los vasos renales, los glomérulos, los túbulos, el intersticio renal y partes de la vía urinaria fuera del riñón incluidos los uréteres y la vejiga (Guyton y Hall, 2006).

1.4.1. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

Las causas de la IRA pueden dividirse en tres categorías principales:

1. IRA resultado de un menor aporte sanguíneo renal; este trastorno a menudo se denomina IRA prerrenal para reflejar el hecho de que la anomalía se produce en un sistema previo a los riñones. Esto puede ser la consecuencia de una insuficiencia cardíaca con un menor gasto cardíaco y una presión arterial baja o de trastornos asociados a un menor volumen sanguíneo y a una presión arterial baja, como una hemorragia grave.

2. IRA intrarrenal debido a anomalías dentro del propio riñón, incluidas las que afectan los vasos sanguíneos, los glomérulos o los túbulos.
3. IRA posrenal, debida a una obstrucción del sistema colector urinario en cualquier lugar entre los cálices y la salida vesical. Las causas más comunes de obstrucción de la vía urinaria fuera del riñón son los cálculos renales debidos a la precipitación de calcio, urato o cistina.

1.4.1.1. IRA INTRARRENAL CAUSADA POR ANOMALÍAS DENTRO DEL RIÑÓN

La IRA intrarrenal puede dividirse en: trastornos que lesionan los capilares glomerulares u otros vasos renales pequeños, trastornos que lesionan el epitelio tubular renal y trastornos que lesionan el intersticio renal.

Un tipo de glomerulonefritis aguda es la post-infecciosa, que es un tipo de IRA intrarrenal causada habitualmente por una reacción inmunitaria anormal que lesiona los glomérulos. La inflamación aguda de los glomérulos suele mejorar en aproximadamente 2 semanas, y en la mayoría de los pacientes los riñones recuperan una función casi normal en las siguientes semanas o meses. Sin embargo, algunas veces se han destruido muchos glomérulos para su recuperación y un pequeño porcentaje de pacientes sufrirá indefinidamente un deterioro renal progresivo que dará origen a insuficiencia renal crónica.

En de la IRA intrarrenal se observa la **necrosis tubular**, es decir, destrucción de las células epiteliales en los túbulos. Algunas causas comunes de la necrosis tubular son: la isquemia grave y el aporte inadecuado de oxígeno a las células epiteliales tubulares, y los venenos, toxinas o medicamentos que destruyen las células epiteliales tubulares.

La isquemia grave del riñón puede deberse a un choque circulatorio o a cualquier otro trastorno que deteriore gravemente el aporte sanguíneo al riñón. Si la isquemia es lo suficientemente intensa para alterar gravemente el transporte de oxígeno y de nutrientes a las células epiteliales tubulares renales, y la agresión es

prolongada, las células epiteliales pueden lesionarse o destruirse. Cuando esto ocurre, las células tubúlares se “desprenden” y tapan muchos de los túbulos, de manera que las nefronas afectadas no producen orina, aunque el flujo sanguíneo renal se normalice. Las causas más importantes de lesión isquémica del epitelio tubular son las causas prerrenales de IRA asociadas a choque circulatorio.

Los tóxicos renales y los medicamentos pueden lesionar el epitelio tubular y provocar una IRA. Ejemplo de ellos son tetracloruro de carbono, metales pesados (como el mercurio, plomo y cromo), etilenglicol, varios insecticidas y medicamentos usados como antibióticos (tetraciclinas) y cis-platino (usado para tratar ciertos cánceres). Cada una de estas sustancias tiene una acción tóxica específica sobre las células epiteliales tubulares del riñón que causa la muerte de muchas de ellas. Las células epiteliales se desprenden de la membrana basal y obstruyen los túbulos. En algunos casos también se destruye la membrana basal, si permanece intacta pueden crecer nuevas células tubulares a lo largo de la superficie de la membrana, de manera que el túbulo se repara a sí mismo en 10-20 días (Guyton y Hall, 2006).

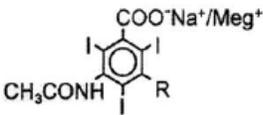
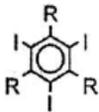
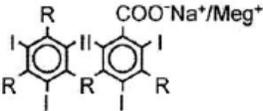
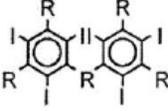
2. MEDIOS DE CONTRASTE

El tejido óseo se observa claramente en las imágenes de rayos-X, pero los órganos o tejidos no lo hacen. Los medios de contraste, a menudo se utilizan durante los exámenes médicos de estudios de imagen para resaltar partes específicas del cuerpo y hacerlas visibles (ASRT, 2001).

El medio de contraste yodado es clasificado por su osmolaridad (concentración total de partículas en solución) en medio de contraste de alta osmolaridad (MCAO, aproximadamente 2000 mOsm/kg), medio de contraste de baja osmolaridad (MCBO 600-800 mOsm/kg) y medio de contraste isoosmolar (MCIO 290 mOsm/kg). Los últimos 40 años, las osmolaridades de los medios de contraste disponibles se han disminuido gradualmente a niveles fisiológicos. En los 1950s,

solo se utilizaban MCAO (vgr. diatrizoato) con una osmolaridad 5-8 veces la del plasma. En los 1980s, se introdujeron los agentes MCBO (iohexol, iopamidol e ioxaglato) con una osmolaridad 2-3 veces mayor a la del plasma. En los 1990s, se desarrolló iodixanol (agente iso-osmolar no ionico) con la misma osmolaridad que la sangre (Tabla 1).

Tabla 1. Estructuras químicas de los medios de contraste

Estructura	Década	Ejemplos
	1950s	Monómero iónico Diatrizoato Iotalamato
	1980s	Monómero no iónico Iopamidol Iohexol Ioversol
	1980s	Dímero iónico Ioxaglato
	1990s	Dímero no iónico Iodixanol

R=-CO-ONa, -CO-NH-CH₃, -NH-CO-CH₂OH, -NH-CO-CHOH-CH₃, -CO-NH-CH₂-CHOH-CH₂OH, -CO-NH-CH-(CH₂OH)₂, etc.

Aunque se creía que el uso de MCBO más que MCAO disminuiría la incidencia nefropatía causada por medio de contraste, no se han encontrado diferencias significativas entre el uso de uno y otro. MCIO y MCBO son apropiados para pacientes que requieren administración intravenosa de medio de contraste iodado (Davidson et al., 2006).

2.1. MD-76R™

El MD-76R™ es un MCAO. Es un fármaco que se inyecta para facilitar la visualización de órganos y tejidos a través de tomografía computarizada, rayos X y procedimientos de imagenología fluoroscópica. Cada mililitro de MD-76R™ contiene 660 mg de diatrizoato meglumina y 100 mg de diatrizoato de sodio (Fig. 5), 0.125 mg de fosfato monobásico de sodio y 0.11 mg de edetato disódico de calcio. La solución contiene aproximadamente 3.65 mg (0.16 mEq) de sodio en cada mililitro y 37% (370 mg/ml) de yodo unido orgánicamente. La viscosidad de la solución es de 16.4 cP a 25°C y 10.5 cP a 37°C. Es hipertónico para la sangre con una osmolaridad de 1,551 mOsm/kg. Estudios clínicos sugieren que la hipertonidad del diatrizoato produce efectos hemodinámicos significativos.

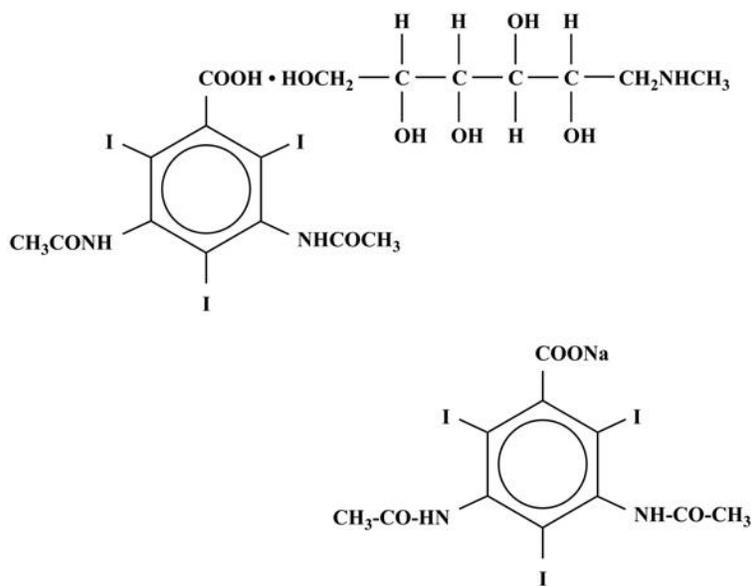


Figura 5. Estructura de diatrizoato meglumina (arriba) y diatrizoato de sodio (abajo).

Las reacciones más frecuentes son: náusea, vomito, bochornos, o un sentimiento generalizado de calor. Pero también pueden ocurrir: escalofríos, fiebre, sudoración, dolor de cabeza, vértigo, palidez, debilidad y ahogamiento asmático, una elevación o la caída en la presión arterial, urticaria, prurito, erupciones, edema, calambres, temblores, comezón, estornudo y lagrimeo.

Después de la inyección intravascular, el MD-76R™ es transportado rápidamente a los riñones y es excretado en la orina por filtración glomerular. La farmacocinética de la administración intravascular del medio de contraste es descrita como un modelo de dos compartimentos con una fase alfa rápida para la distribución y una fase beta lenta para la eliminación. En pacientes con una función renal normal, el tiempo de vida media para cada fase es 10 min para la fase alfa y 100 min para la fase beta.

Las sales de diatrizoato atraviesan la barrera placentaria y son excretadas en la leche materna en los humanos.

Beneficios. Alto contenido de yodo para una buena visualización y una alternativa económica para los procedimientos cardiacos de imagenología.

Aplicaciones. Urografía excretora, aortografía, arteriografía periférica, arteriografía renal selectiva, arteriografía visceral selectiva, arteriografía coronaria selectiva, tomografía computarizada de craneo, tomografía computarizada corporal (MD-76R).

2.2. IRA CAUSADA POR MEDIO DE CONTRASTE (IRA-MC)

La IRA-MC se define típicamente como un aumento de los niveles de creatinina en suero (SCr; de 0.5 mg/dl ó un 25%) en las primeras 24 h posteriores a la exposición al medio de contraste, alcanzando el máximo 5 días más tarde (McCullough, 2008; Weisbord y Palevsky, 2005). La primera asociación entre el uso de medio de contraste y el daño renal se reportó por primera vez hace más de 50 años (Davidson et al., 2006).

La fisiopatología de IRA-MC asume una reducción en el número de nefronas, con vasoconstricción aguda causada por la liberación de adenosina, endotelina y otros vasoconstrictores inducidos por el medio de contraste yodado; el mecanismo se ilustra en la figura 6. Después, se da una reducción sostenida, de

aproximadamente 50% del flujo sanguíneo renal durante varias horas. La presencia de medio de contraste iodado en los túbulos renales y en los conductos colectores provoca daño celular directo y muerte de las células del túbulo renal. El grado de citotoxicidad de las células de túbulo renal está directamente relacionado con la duración de la exposición de las células al medio de contraste (Persson et al., 2005).

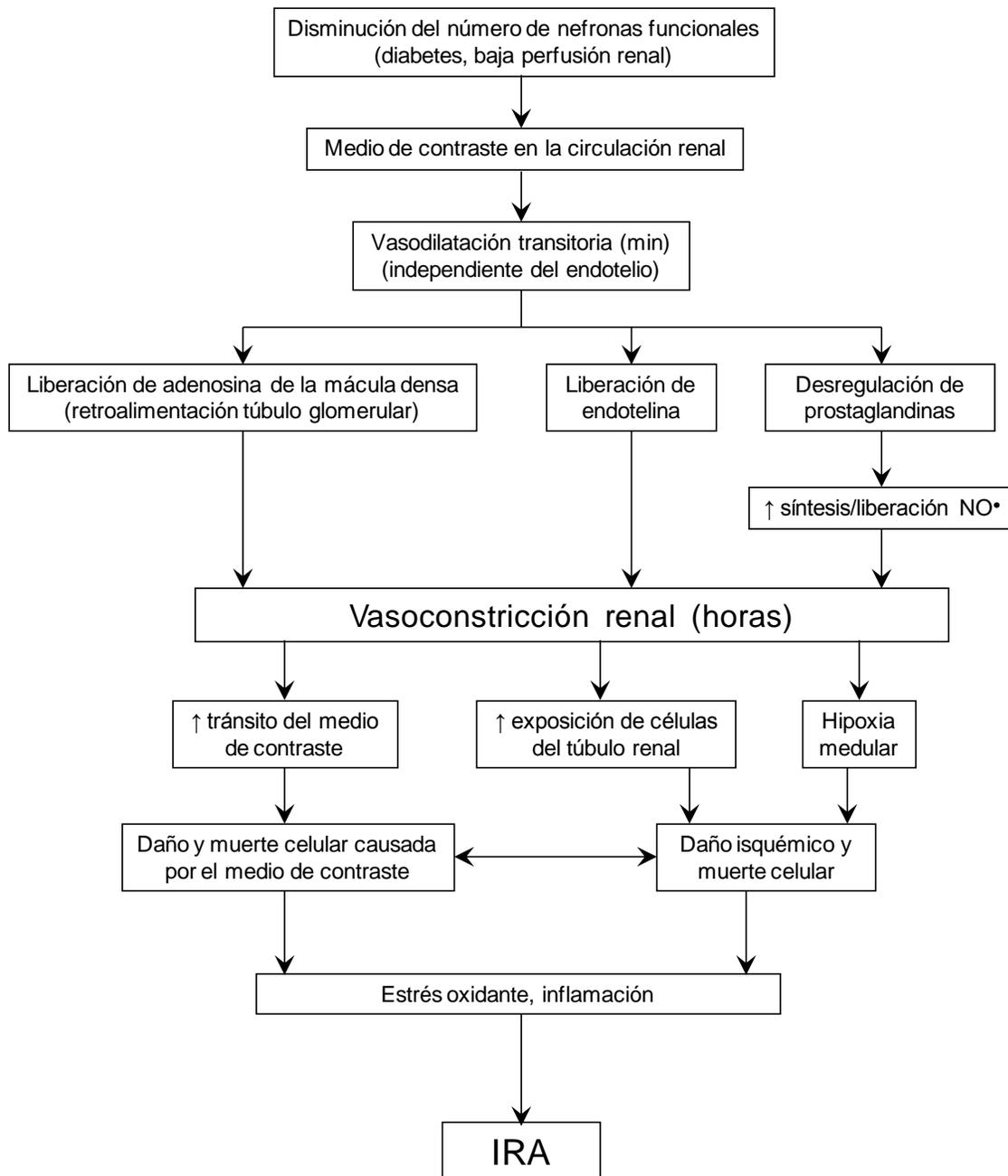


Figura 6. Propuesta de la fisiopatología de la IRA-MC, modificado de McCullough (2008).

2.2.1. MEDIDAS PARA EVITAR LA IRA-MC

La IRA es una complicación importante en el uso de medio de contraste iodado. Debido a esto, se ha establecido una serie de factores a considerar antes de administrar medio de contraste a un paciente. En el 2006, un grupo de especialistas multidisciplinarios ejerciendo en Europa y EUA, publicaron las siguientes guías (Becker et al., 2006; Davidson et al., 2006; Lameire et al., 2006; McCullough et al., 2006a,b; Stacul et al., 2006; Tumlin et al., 2006):

1. La IRA-MC es una complicación común y potencialmente seria después de la administración de medio de contraste en pacientes en riesgo de IRA.
2. El riesgo de IRA-MC es elevada y de importancia clínica en pacientes con enfermedad renal crónica (particularmente cuando la diabetes está presente), reconocida por una velocidad de filtración glomerular (VFG) <60 ml/min/1.73 m².
3. Cuando la SCr o la eVFG no están disponibles, entonces se aplica un cuestionario para identificar pacientes en mayor riesgo de IRA-MC que la población general.
4. En el escenario de procedimiento de emergencia, donde el beneficio de una detección temprana pesa más que el riesgo de esperar, el procedimiento se realiza sin conocimiento del nivel de SCr o de la VFG.
5. La presencia de múltiples factores de riesgo para IRA-MC en el mismo paciente pueden generar un riesgo alto (aproximado de 50%) de IRA-MC y (aproximadamente un 15%) de requerir diálisis después de la exposición al medio de contraste.
6. En pacientes con riesgo elevado de IRA por la administración intra-arterial de medio de contraste, los agentes iónicos de alta osmolaridad tienen un mayor riesgo para inducir IRA-MC que los agentes de baja osmolaridad. Hay evidencias que sugieren que para la administración intra-arterial en pacientes de alto riesgo con enfermedad renal crónica, particularmente

aquellos con diabetes mellitus, los medios de contraste no iónicos iso-osmolares se asocian con un menor riesgo de IRA-MC.

7. Los volúmenes grandes de medio de contraste (>100 ml) están asociados con mayor índice de IRA-MC en pacientes en riesgo. Sin embargo, los volúmenes pequeños de medio de contraste (alrededor de 30 ml) en pacientes de muy alto riesgo pueden causar IRA, requiriendo diálisis, lo que sugiere la ausencia de un efecto umbral.
8. La administración intra-arterial de medio de contraste iodado parece tener un gran riesgo de IRA superior al que se presenta con administración intravenosa.
9. La expansión de volumen adecuado con cristaloides isotónicos (1-1.5 ml/kg/h) por 3-12 h antes del procedimiento y continuado 6-24 h después puede disminuir la probabilidad de IRA-MC en pacientes en riesgo. Los datos para la expansión de volumen oral sugieren que esta vía no es adecuada.
10. El tratamiento médico no ha sido eficaz en la reducción del riesgo de IRA-MC.

Se han propuesto algunas estrategias para reducir el riesgo de IRA-MC:

- Restringir el uso de AINEs, inhibidores de calcineurina, dosis altas de diuréticos del asa, aminoglicosidos, y otros agentes nefrotóxicos, si es posible varios días antes de la exposición al medio de contraste.
- Evitar la deshidratación.
- Remover el medio de contraste por diálisis, aunque no hay evidencia clínica de que la diálisis profiláctica reduzca el riesgo de IRA-MC.
- Uso de estatinas, aminofilina/teofilina y prostaglandina E1 (Stacul et al., 2006).
- Uso de antioxidantes como el ácido ascórbico y la NAC.

El ácido ascórbico ha resultado efectivo en dosis de 3 g una noche antes y 2 g dos veces al día después del procedimiento (Spargias et al., 2004).

Los resultados con la NAC no han sido consistentes, parece disminuir SCr y fundamentalmente no protege contra la IRA-MC. El uso de suplementación de bicarbonato de sodio junto con NAC fue más efectivo que la NAC sola reduciendo el riesgo de IRA-MC (Briguori et al., 2007). La dosis de NAC aprobada es de 1.2 g dos veces al día antes y después del procedimiento (McCullough, 2008).

3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y DE NITRÓGENO (ERN)

El término “ERO” es amplio e incluye radicales libres de oxígeno y cualquier otra molécula que contenga oxígeno en la que el átomo de éste tiene una reactividad mayor que el oxígeno molecular (O_2) (González et al., 2007). Las ERO incluyendo $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , radical hidroxilo ($\bullet OH$) y oxígeno singulete (1O_2) son generados como productos de metabolismo celular normal (Elstner, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1985; Tang et al., 2004; Wang y Jiao, 2000) y no sólo bajo condiciones patológicas (Commoner et al., 1954).

La mitocondria es la principal fuente de producción de ERO en células eucariontes. Se estima que de 2-5% del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria escapan para producir $O_2^{\bullet-}$ (Cadenas y Davies, 2000; Chance et al., 1979; Fridovich, 1989; Sas et al., 2007). La velocidad de producción de $O_2^{\bullet-}$ de la mitocondria se ha estimado en aproximadamente 1.2 nmol/min/mg (Boveris et al., 1972). La xantina oxidasa también se ha identificado como una fuente potencial de ERO en el citosol de fibras musculares. En la conversión enzimática de hipoxantina a xantina, el $O_2^{\bullet-}$ aparece como un derivado (Apple et al., 1991; Laughlin et al., 1990; McCutchan et al., 1990). Fuentes enzimáticas adicionales de ERO pueden incluir a las NADPH-oxidasas (Duncan y Rudge, 1988; Dinger et al., 2007), monoaminoxidasa (MAO), óxido nítrico sintasa (NOS), (Sas et al., 2007) oxidasas sarcoplásmicas (Crane et al., 1985; Freeman y Crapo, 1982), y enzimas del metabolismo del ácido araquidónico incluyendo ciclooxigenasas (Okabe et al.,

1985), lipoxigenasas y citocromo P450 (Freeman y Crapo, 1982). Los tipos de células que liberan ERO y ERN en el espacio extracelular incluyen células endoteliales (Babbs et al., 1991; Marin y Rodríguez-Martínez, 1995; Mitchell y Tymi, 1996; Panus et al., 1993), células vasculares de músculo liso (Charpie y Webb, 1993; Mohazzab-H y Wolin, 1994), neuronas motoras (Riberia et al., 1998), leucocitos (Suzuki et al., 1996) y eritrocitos (Stamler et al., 1997).

Tabla 2. Especies oxidantes reactivas de mayor importancia biológica

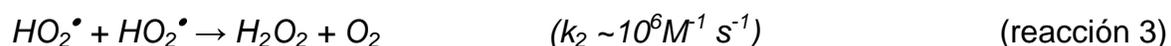
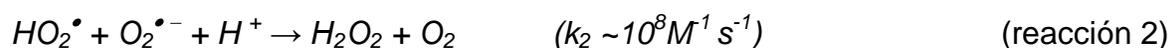
Especies reactivas de oxígeno (ERO)		Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	
Radicales		Radicales	
Anión superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Radical óxido nítrico	NO^{\bullet}
Radical hidroxilo	$\bullet OH$	Radical dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}
Radical peroxilo	$\bullet OOR$		
Radical hidroperoxilo	$\bullet OOH$		
Radical alcoxilo	$\bullet OR$		
Radical protein hem ferrilo	$\bullet X-[Fe^{(IV)}=O]$		
No radicales		No radicales	
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Ácido nitroso	HNO_2
Ácido hipocloroso	$HOCl$	Catión nitrosilo	NO^+
Ozono	O_3	Anión nitroxilo	NO^-
Oxígeno singulete	1O_2	Trióxido de nitrógeno	N_2O_3
		Peroxinitrito	$ONOO^-$
		Alquilperoxinitritos	$ROONO$

La molécula origen en la generación de ERO es un radical libre, el $O_2^{\bullet -}$. La cascada de ERO incluye otras especies de radicales libres, incluyendo $\bullet OH$ y radicales hidroperoxilo (HOO^{\bullet} ó HO_2^{\bullet}), también incluyen derivados de oxígeno que

no son radicales libres, por ejemplo el H_2O_2 (González et al., 2007). La cascada de ERN incluye como radical origen el NO^\bullet y un arreglo de derivados redox activos que incluyen dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (Murrant y Reid, 2001). En la tabla 2 se presentan las ERO y ERN de importancia biológica (Roberfroid y Calderon, 1995).

3.1. ANIÓN SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet-}$)

El $O_2^{\bullet-}$ es el radical libre más importante producido por la ganancia de un electrón en los sistemas biológicos (reacción 1), puede actuar como un agente reductor y oxidante. La difusión del $O_2^{\bullet-}$ a través de las membranas puede restringirse debido a la carga y la reactividad (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1986; Rosen y Freeman, 1984). El $O_2^{\bullet-}$ reacciona con algunas moléculas y genera nuevos radicales libres, pero también puede reaccionar consigo mismo de tal manera que un $O_2^{\bullet-}$ se oxida a O_2 y el otro se reduce a H_2O_2 . Esto constituye la reacción de dismutación espontánea (Freeman y Crapo, 1982; Murrant y Reid, 2001). Mecanísticamente, la reacción de dismutación en los fluidos biológicos ocurre por protonación de uno o ambos $O_2^{\bullet-}$ a HO_2^\bullet . Esta reacción de dismutación espontánea puede ocurrir de dos maneras (reacciones 2 y 3).



Además de la dismutación espontánea, el grupo de enzimas, SOD eliminan específicamente al $O_2^{\bullet-}$.

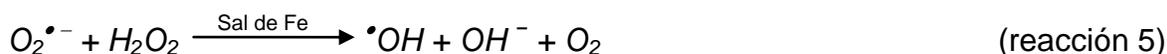
El $O_2^{\bullet-}$ puede reducir varias proteínas que contengan algún metal de transición (por ejemplo, citocromo c). Las reacciones particularmente relevantes del $O_2^{\bullet-}$ con metales de transición ocurren en sitios conteniendo hierro-azufre, existentes en

varias enzimas y acarreadores del transporte de electrones en la cadena respiratoria.

El $O_2^{\bullet -}$ o su forma protonada HO_2^{\bullet} puede reaccionar con otros radicales libres, como por ejemplo con el NO^{\bullet} para formar $ONOO^-$ (reacción 4) (Halliwell y Gutteridge, 1992; Murrant y Reid, 2001; Sas et al., 2007). El cual ($^{\bullet}O-O-N=O$) es uno de los isómeros más reactivos del nitrato (González et al., 2007).



El $O_2^{\bullet -}$ en solución acuosa no es muy reactivo y se sugiere que muchos de sus efectos dañinos se deben a la formación de $^{\bullet}OH$ (Halliwell y Gutteridge, 1985) dependiente de $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 (Beauchamp y Fridovich, 1970). En presencia de trazas de sales de hierro (Fe) este proceso se conoce como la reacción de Haber-Weiss (reacción 5) (Deby y Goutier, 1990; Halliwell, 1978b,c, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1990; McCord y Day, 1978).



3.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2)

El H_2O_2 es formado en los organismos durante las reacciones de oxidación de quinonas, por la oxidación de compuestos que contienen grupos sulfhidrilos, por la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ o bien, por acción de la SOD (Freeman, 1984). El H_2O_2 no es un radical en sí debido a que tiene todos sus electrones apareados. Es un agente oxidante y reductor débil, por lo tanto poco reactivo; sin embargo puede difundir a través de las membranas (Nath y Norby, 2000).

En presencia de Fe^{3+} , el H_2O_2 puede participar en la reacción de Fenton (reacción 6) para formar $^{\bullet}OH$ (Deby & Goutier, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1990,1992).



La velocidad de producción de H_2O_2 es relativamente alta en todas las células representando alrededor de 1–3% del consumo total de O_2 , principalmente como una ERO secundaria debido a la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet -}$; (Halliwell y Gutteridge, 1999). Sin embargo, la reacción de Fenton en células normales es mínima porque los sistemas que disponen H_2O_2 , CAT y GPx (Murrant y Reid, 2001), lo conservan en concentración muy baja (en el rango de nanomolar; Chance et al., 1979) y porque las concentraciones de metales de transición como los iones libres son incluso bajas. Normalmente, las proteínas forman complejos con los metales de transición, para limitar su reactividad.

3.3. RADICAL HIDROXILO ($\bullet\text{OH}$)

El $\bullet\text{OH}$ es producido cuando el agua (H_2O) es expuesta a radiación ionizante (Von Sonntag, 1987). Debido a su alta reactividad tiene una vida media muy corta y está, por consiguiente, presente en concentraciones sumamente bajas (Murrant y Reid, 2001). El $\bullet\text{OH}$ reacciona con lipoproteínas, otras proteínas y constituyentes de líquidos corporales como el ácido hialurónico (Halliwell, 1981; González et al., 2007). Cualquier $\bullet\text{OH}$ formado *in vivo* reaccionará con cualquier molécula presente en el sitio de formación, lo que hace difícil atrapar $\bullet\text{OH}$ y demostrar su formación directamente en sistemas biológicos (Halliwell y Gutteridge, 1999). El ataque de $\bullet\text{OH}$ sobre ADN genera múltiples productos (Steenken, 1989; Von Sonntag, 1987), las bases púricas y pirimídicas son modificadas (Dizdaroglu, 1990; Halliwell y Aruoma, 1991).

3.4. OTRAS ESPECIES REACTIVAS

Aunque las ERO más importantes son H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet -}$ y $\bullet\text{OH}$, hay otras ERO que son radicales libres como el HO_2^{\bullet} , los radicales alcoxil (RO^{\bullet}) y los radicales peroxil (RO_2^{\bullet}). De hecho HO_2^{\bullet} es el radical peroxil más simple. En otros radicales libres en los que el átomo reactivo no es oxígeno se agrupa la mayoría de los radicales

biológicamente relevantes entre los que se encuentran: (1) metales de transición como Fe, cobre (Cu) y manganeso (Mn) que tienen varios electrones desapareados y dos números de oxidación principales (Fe^{2+} y Fe^{3+} ; Cu^+ y Cu^{2+} ; Mn^{2+} y Mn^{3+}) permitiéndoles aceptar o donar un electrón; (2) radicales con centro de carbono formados por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un enlace C-H (reacción 7); (3) radicales con centro de azufre (radicales tiil) formados en la reacción de moléculas que contienen SH con metales de la transición (glutatión reducido; reacción 8) o por rompimiento homolítico de enlaces disulfuro en las proteínas u oxidación del glutatión (reacción 9) (González et al., 2007).



4. ESTRÉS OXIDANTE

Un aumento en los niveles de ERO o radicales libres genera estrés oxidante resultado de un desequilibrio en el balance redox. El estrés oxidante lleva a alteraciones bioquímicas y fisiológicas que pueden deteriorar el metabolismo, causando daño oxidante a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que eventualmente resulta en muerte celular (Heinonen et al., 1998; Rice-Evans y Miller, 1996; Satue-Gracia et al., 1997; Chance et al., 1979; Fridovich, 1975,1978; Halliwell 1978a, 1981; Tang et al., 2004). El daño oxidante está asociado con el envejecimiento y numerosas enfermedades humanas (Finkel y Holbrook, 2000; Halliwell, 1991; Halliwell y Aruoma, 1992; Halliwell y Gutteridge, 1999; Maxwell, 1995; Mujahid et al., 2007; Ross et al., 1997; Steinberg, 1991), por ejemplo: inflamación, cáncer, aterosclerosis, diabetes mellitus (Ames et al., 1995; Barthomeuf et al., 2001; Remacle y Renard, 1996), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Wilson, ataxia de Friedreich y esclerosis múltiple

(Chaudhury y Saeker, 1983; Fang, 1989; Kozumbo et al., 1985; Sas et al., 2007), necrosis tubular aguda causada por numerosas fallas renales incluyendo daño por isquemia/reperfusión, nefrotoxicidad por sustancias químicas (Baud y Ardaillou, 1986; Nath et al., 1996; Shah y Walker, 1992; Walker y Shah, 1987; Weinberg, 1991) e IRA (Ueda et al., 1995).

El daño causado por las ERO es contrarrestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares y los mecanismos de recambio y reparación. Los mecanismos antioxidantes son muy diversos y en cada organismo, célula o tejido predominan unos sobre otros. Hay compuestos antioxidantes con varias funciones, enzimas antioxidantes que mantienen en forma reducida dichos compuestos antioxidantes y enzimas que atrapan las especies reactivas evitando, así, la formación de otras especies más reactivas. Muchos otros compuestos y enzimas contribuyen de diversas maneras a mantener el estado celular redox (Hansberg, 2002).

5. ANTIOXIDANTES

Existen dos grandes sistemas de defensa contra el estrés oxidante 1) las enzimas antioxidantes y 2) los antioxidantes no enzimáticos.

5.1. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Son una serie de enzimas destinadas a convertir las ERO en moléculas menos reactivas, antes de que reaccionen y dañen estructuras celulares.

5.1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La SOD es una familia de enzimas que catalizan eficazmente la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 (reacción 10):



En los mamíferos, esta familia está formada por tres miembros, de los cuales dos son intracelulares y uno extracelular. La SOD que tiene un centro catalítico un Cu y un zinc (Zn) (CuZn-SOD o SOD1) se ubica en el citoplasma, el núcleo y la membrana externa de la mitocondria. La SOD2 está ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial, tiene Mn en su centro catalítico (Mn-SOD). La SOD3 está asociada a la matriz extracelular, en su centro catalítico tiene Cu y Zn (EC-SOD).

La compartimentación de las diferentes SOD se explica en gran medida por el hecho de que el $O_2^{\bullet -}$ no puede cruzar con facilidad las membranas que separan los compartimentos celulares y mitocondriales. Recientemente se ha reportado que dado que el $O_2^{\bullet -}$ puede reaccionar con otras moléculas, es capaz de originar especies intermediarias que le faciliten la permeabilidad y puedan escapar de los efectos protectores de las SOD y ejercer su toxicidad. Un buen ejemplo de ello es la gran facilidad que tiene el $O_2^{\bullet -}$ para reaccionar con el NO^{\bullet} para formar el $ONOO^-$, el cual puede atravesar las membranas lipídicas utilizando algunos canales iónicos.

La SOD1 se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y en la membrana externa mitocondrial. Es un homodímero de 32 kDa con un Cu y un Zn por cada subunidad de 153 aminoácidos. El Cu tiene importancia catalítica, mientras que el Zn confiere estabilidad a la estructura proteínica, ambos metales están muy conectados por un imidazolato que provee la histidina 63. La CuZn-SOD es muy resistente a la desnaturalización, se inhibe con cianuro o con un quelante de Cu como el dietilditiocarbamato. El H_2O_2 inhibe la enzima *in vitro*.

La SOD2, aunque se localiza en la mitocondria, está codificada en el núcleo, por lo que su expresión está regulada por el estado redox de la mitocondria. Se desnaturaliza con detergentes o disolvente y no se inhibe con cianuro ni con el dietilditiocarbamato, ni tampoco con el H_2O_2 .

La SOD3 es la única proteína extracelular. La SOD3 humana fue purificada en 1982, es una proteína tetramérica de casi 135 kDa y 222 aminoácidos que contiene un átomo de Cu y uno de Zn por subunidad. A diferencia de las otras SOD, la SOD3 presenta una glucosilación en la aspargina 89.

La SOD3 está presente en la matriz extracelular, principalmente unida a la heparina y a las fibras de colagena tipo I de la mayor parte de los tejidos también se ha encontrado en el plasma y en el fluido linfático y cefalorraquídeo; no obstante, la concentración de SOD3 en la matriz extracelular es 20 veces superior a la presente en el plasma.

El $O_2^{\bullet -}$ generado en la mitocondria o en otros sistemas es convertido por las SOD en H_2O_2 , el cual a su vez también es convertido en H_2O por la CAT o por la GPx. La reacción enzimática es llevada a cabo por la SOD en dos pasos (reacciones 11 y 12), ambas son reacciones enzimáticas de primer orden.



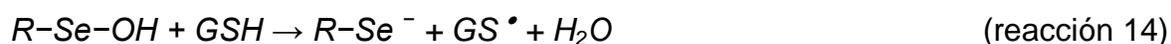
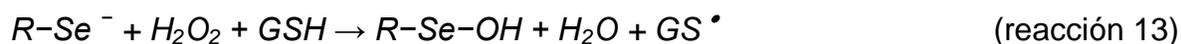
Donde M_{ox} es el estado oxidado de metal en el centro catalítico ($Cu^{2+}Zn^{2+}$ o Mn^{3+}) y M_{red} denota el estado reducido del mismo metal (Cu^+Zn^{2+} o Mn^{2+}) (Gómez y Cuevas, 2008).

5.1.2. GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

La GPx reduce los hidroperóxidos utilizando glutatión reducido (GSH) como agente reductor, aunque las peroxidases de hidroperóxidos de fosfolípidos pueden utilizar tioredoxina, glutaredoxina o tioles proteicos como fuente de poder reductor. Se han descrito peroxidases de glutatión en los animales, plantas, algunas algas, hongos y bacterias. Los mamíferos tienen varias GPx: la citosólica (GPxc, GPx1, 84 kDa), la gastrointestinal (GPxgi, GPx2, 75 kDa), la plasmática (GPxp, GPx3, 100 KDa) y la de hidroperóxidos de fosfolípidos (GPxpl, GPx4)

(Brigelius-Flohé, 1999). Son homotetrámeros con la excepción de la GPx4 que es un monómero de tamaño menor al de las subunidades de las otras GPx. La GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos es capaz de actuar sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol. Todas las GPx son capaces de reducir el H₂O₂ y los hidroperóxidos de ácidos grasos; sin embargo, la GPx plasmática también lo hace con lípidos complejos, como el hidroperóxido de fosfatidilcolina o hidroperóxidos en algunas proteínas como la tioredoxina. La GPx citosólica es la enzima más abundante sobre todo en los eritrocitos, el hígado, los riñones y los pulmones. La GPx plasmática no sólo está en el plasma sanguíneo sino en la mayoría de las secreciones corporales. Se sintetiza en el riñón y de ahí es liberada a la sangre. La GPx gastrointestinal sólo se encuentra en el epitelio del tracto digestivo y en el hígado.

En los mamíferos estas enzimas tienen la particularidad de tener en su sitio activo una selenocisteína, una cisteína en la cual el azufre ha sido reemplazado por el Se. La selenocisteína está codificada por el codón de terminación UGA pero el mecanismo de traducción reconoce una determinada conformación del mRNA e introduce en ese codón un tRNA con una serina transformada enzimáticamente en selenocisteína. El Se está como selenolato y reacciona con el H₂O₂ para formar ácido selénico y H₂O (reacción 13), o alcohol en el caso de los alquilperóxidos (reacción 16). El GSH reacciona con el ácido selénico para formar otra molécula de H₂O y una segunda molécula de GSH reacciona con el GSH unido para formar glutatión oxidado (GSSG) (reacciones 14 y 15).



5.1.3. CATALASA (CAT)

Las CAT monofuncionales dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O , lo hacen con una gran eficiencia a cualquier pH entre 4 y 11. Son enzimas muy resistentes a agentes desnaturalizantes y disolventes orgánicos. Se inactivan con 3-amino-1,2,4-triazol y se inhiben con cianuro y azida (Díaz et al., 2001). Son homotetrámeros u homodímeros de subunidades de ~60 kDa o de ~80 kDa. Hay varios subgrupos de CAT: uno en plantas, uno en animales, uno de hongos, dos de bacterias y uno de bacterias y hongos en donde se encuentran las CAT grandes (Klotz et al., 1997). Cada subunidad contiene una ferro-protoporfirina-IX (hemo *b*) o derivados del mismo, como el hemo *d* o una clorina (Lledías et al., 1998). El hemo por sí solo cataliza la dismutación del H_2O_2 aunque con mucha menor eficiencia que la CAT. Las CAT monofuncionales tienen un canal estrecho que conduce a la parte distal del hemo en donde una histidina y una aspargina participan en la reacción junto con el Fe^{3+} y el hemo. El Fe^{3+} no tiene enlace de coordinación en la parte distal y en la parte proximal el enlace es con una tirosina muy conservada. El canal estrecho y la falta de coordinación del Fe^{3+} en el lado distal tienen que ver con la selectividad por el H_2O_2 de estas enzimas, aunque también son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas, como: formato, metanol o etanol (actividad peroxidasa). Al entrar un H_2O_2 al sitio activo toma un electrón del Fe y otro del hemo para generar una molécula de H_2O , un ferroxilo (reacción 17) y un radical porfirínico catiónico (no se muestra). Una segunda molécula de H_2O_2 cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de O_2 y otra de H_2O (reacción 18) (Putnam et al., 2000).



5.1.4. HEMO OXIGENASA (HO)

La HO es la enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad de degradación del grupo hemo. Éste es un grupo prostético que contiene Fe que se une al O₂, y que se encuentra en proteínas como: hemoglobina, mioglobina y citocromos (Platt y Nath, 1998).

La HO se encuentra principalmente en dos isoformas HO-1 y HO-2. Recientemente se ha descrito una tercera isoforma HO-3 (en menor cantidad). Las tres isoformas catalizan la degradación del grupo hemo (Kitchin et al., 2001), los productos de la dicha reacción son monóxido de carbono (CO), Fe y biliverdina. En una reacción posterior, la biliverdina reductasa produce bilirrubina a partir de biliverdina (Orozco-Ibarra y Pedraza-Chaverrí, 2008; Mahin, 1992).

Muchas funciones celulares y biológicas se han atribuido a las isoformas de HO y a los productos enzimáticos especialmente al CO. Las tres isoformas son genéticamente diferentes y en pequeña proporción en términos de estructura primaria, regulación y distribución en tejidos. La HO-2 (36 kDa) es expresada constitutivamente y la HO-1 (32 kDa) es inducible por muchos tratamientos, particularmente estrés oxidante causado por condiciones como disminución de GSH, H₂O₂, hiperoxia, exposición a metales pesados, hipoxia, choque térmico, irradiación, agentes quimioterapéuticos, productos microbianos, hormonas, citocinas y el mismo grupo hemo (Naughton et al., 2002). Comúnmente se considera que la inducción de HO-1 responde al daño oxidante y ayuda a restaurar el potencial redox en la célula (Kitchin et al., 2001), permitiendo a las células resistir la exposición a estímulos nocivos (Platt y Nath, 1998; Dong et al., 2000).

5.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Son algunos compuestos que poseen la capacidad de interactuar directamente con las ERO.

5.2.1. GLUTATIÓN (GSH)

El tripéptido (glutamato-cisteína-glicina) GSH se sintetiza continuamente dentro de la célula y se degrada fuera de ella. Es el tiol celular más abundante; se mantiene a una concentración milimolar y es particularmente alta en el cristalino y en los eritrocitos de los mamíferos y en los cloroplastos de las plantas. El GSH tiene varias funciones: participa en la formación y ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas, contribuye a desechar el H_2O_2 con la GPx y es cofactor de algunas enzimas (Mullineaux y Creissen, 1997). El GSH se utiliza también en el metabolismo de los xenobióticos a través de la glutatión transferasa. La cual es una enzima dimérica pequeña que conjuga los xenobióticos con el GSH para desecharlos o degradarlos (Sies y Ketterer, 1988). También metaboliza los peróxidos orgánicos formando alcoholes y glutatión oxidado (GSSG).

Casi todo el GSH se mantiene en su forma reducida principalmente a través de la glutatión reductasa. En el estrés oxidante se forma gran cantidad de GSSG, que se secreta y se degrada (Toledo et al, 1991). El GSH reacciona con el 1O_2 y con muchos radicales, aunque con el $O_2^{\bullet-}$ lo hace lentamente.

5.2.2. ÁCIDO ASCÓRBICO

Las plantas y muchos animales producen ácido ascórbico a partir de la glucosa. Los primates perdieron la última enzima de su biosíntesis, la L-gluco- γ -lactona oxidasa. Ya que el ácido ascórbico es cofactor de varias hidrolasas, es un compuesto esencial para el hombre por lo que debe consumirlo en su dieta, de otro modo padecerá escorbuto. El ácido ascórbico o vitamina C se encuentra en la mayoría de las frutas y los vegetales. El ácido ascórbico es muy soluble en agua y se encuentra en concentraciones altas en todos los tejidos, especialmente en el ojo y en el pulmón. Tiene dos hidroxilos ionizables que hacen de él un excelente agente reductor.

El ácido ascórbico se utiliza para desechar el H_2O_2 por la peroxidasa de ascorbato, reacciona con el $^1\text{O}_2$, el ácido hipocloroso, el ONOO^- , los radicales peroxilo y el radical tocoferilo. El radical ascorbilo (monodeshidroascorbato) que se forma es estable y espontáneamente puede regenerar el ácido ascórbico y el dideshidroascorbato. Este último se descompone en ácido oxálico y ácido treónico o es reabsorbido y reducido por la glutarredoxina y el GSH. El ácido ascórbico es un excelente antioxidante siempre y cuando no esté en presencia de Fe o Cu, pues en esas condiciones se genera el $\bullet\text{OH}$.

5.2.3. α -TOCOFEROL

El α -tocoferol o vitamina E es un compuesto esencial que el hombre obtiene de los aceites vegetales. Se absorbe junto con otras grasas formando parte de los quilomicrones. El α -tocoferol tiene tres carbonos asimétricos por lo que hay ocho estereoisómeros. El más activo de ellos es el RRR- α -tocoferol y en el hígado sólo éste se transfiere a las lipoproteínas de muy baja densidad (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). Éstas, al incorporar triglicéridos, se convierten en lipoproteínas de baja densidad que en el suero sanguíneo transfieren una parte del α -tocoferol a las lipoproteínas de alta densidad. Las células incorporan el α -tocoferol de las lipoproteínas a las membranas plasmáticas, sobre todo en los segmentos exteriores de los bastones de la retina. En los organismos fotosintéticos, el α -tocoferol se concentra en las membranas de los tilacoides. Estos sitios nos indican la función antioxidante del α -tocoferol como desactivador y recolector del $^1\text{O}_2$. El α -tocoferol reacciona con los radicales lipoperoxilo y el radical tocoferilo producido se puede reducir con el ascorbato y de esta manera se limita la propagación de la lipoperoxidación. El α -tocoferol, al igual que el ascorbato, puede reducir el Fe^{3+} y el Cu^{2+} por lo que puede ser pro-oxidante en presencia de estos metales. La falta de α -tocoferol genera sensibilidad al estrés oxidante (Hansberg, 2002).

En la actualidad, se realizan estudios científicos para determinar las propiedades antioxidantes de muchos productos de origen vegetal que forman parte de la

medicina tradicional y la alimentación cotidiana de muchas culturas. Entre dichos productos encontramos al ginkgo biloba, el té verde, la uva, el nopal, el tamarindo, el ajo, etc. (Barthomeuf et al., 2001; Gilgun et al., 2001; Sies, 1993).

5.2.4. AJO

El ajo (*Allium sativum* L.) (Fig. 7) es una especie de la familia *Liliaceae*. Su tallo, del cual salen varias hojas aplanadas, puede llegar a medir 50 cm de altura. En el extremo terminal del tallo brotan flores, reunidas en grupos formando una estructura llamada umbela. Las flores son pequeñas de color blanco, con un leve tono malva, y están envueltas por un tejido membranoso; surgen como una serie de pequeños bulbos que pueden usarse para que la planta se reproduzca.

La parte comestible del ajo es el bulbo alto o tallo subterráneo, denominado “cabeza” que está compuesto por un conjunto de bulbos menores o “dientes”, todos ellos envueltos por una membrana formada por varias hojas de consistencia similar a la del papel.

El ajo es originario del centro y sur de Asia, desde donde se propagó al área mediterránea y de ahí al resto del mundo.

Las propiedades del ajo se han reconocido por más de 5,000 años. Desde la antigüedad, los babilonios, fenicios, vikingos, chinos, griegos, romanos e hindúes usaron ajo frecuentemente (Block, 1985). Tomaron al ajo como un remedio para desordenes intestinales, parásitos, infecciones respiratorias, enfermedades de la piel, heridas, síntomas de envejecimiento y muchos otros males (Amagase, 2006; Rivlin, 2001). En Egipto, incluso, se descubrieron jeroglíficos alusivos al ajo en las tumbas, fechadas de 3,700 A.C. En el Códice egipcio Ebers (que data de



Figura 7. *Allium sativum* L.

1550 A.C) se documentó que el ajo fue usado como un remedio para la enfermedad del corazón, tumores y dolor de cabeza (Borek, 2001).

La popularidad del ajo como un agente medicinal profiláctico y terapéutico se ha incrementado a través de los siglos. Múltiples publicaciones internacionales han confirmado los beneficios del ajo, que se ha considerado uno de los mejores alimentos que previenen las enfermedades (Amagase, 2006).

5.2.4.1. QUÍMICA DEL AJO

La composición química de las especies de *Allium* está determinada por muchos compuestos que contienen azufre, los cuales le dan el sabor característico. Sin embargo, una variedad de componentes, incluyendo compuestos no azufrados, trabajan sinérgicamente para proveer varios beneficios a la salud (Amagase, 2006).

Los compuestos del ajo son bastante complejos y probablemente corresponden a un mecanismo de defensa. Los principales constituyentes que contienen azufre en el ajo intacto son las γ -glutamyl-S-allyl-L-cysteínas y los S-allyl-L-cysteinsulfóxidos, incluyendo la alina. El ajo intacto típicamente contiene 1% de alina, junto con el (+)-S-metil-L-cisteinsulfóxido (metina) y el (+)-S-(trans-1-propenil)-L-cisteinsulfóxido. En el ajo, también están presentes el S-(2-carboxipropil)-glutathión, la γ -glutamyl-S-allyl-L-cisteína, la γ -glutamyl-S-(trans-1-propenil)-L-cisteína y la γ -glutamyl-S-allyl-mercapto-L-cisteína (Fenwick y Hanley, 1985; Sugii et al., 1964). La alina se acumula naturalmente durante el almacenamiento de los bulbos de ajo a temperaturas bajas. En promedio, un bulbo de ajo contiene más de 0.9% de γ -glutamylcisteínas y 1.8% de alina. Además, los bulbos de ajo intactos contienen grandes cantidades de S-allyl-L-cisteína (SAC). La cual es formada del catabolismo de la γ -glutamylcisteína (Fig. 8).

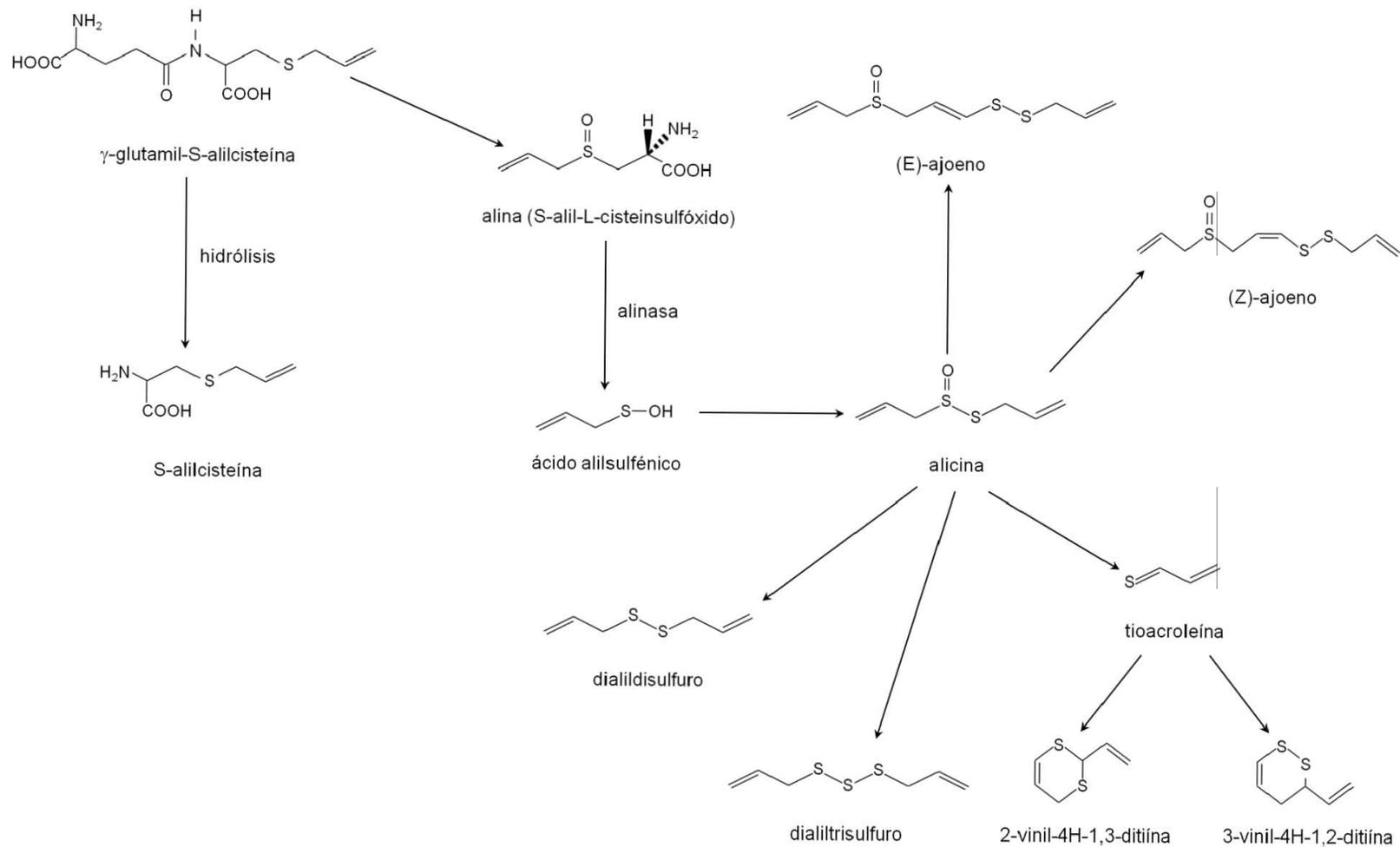


Figura 8. Cambios químicos en el ajo. El ajo intacto contiene grandes cantidades de γ -glutamilcisteínas, cuando estos compuestos son hidrolizados dan origen a la S-aliil-L-cisteína. Por otro lado cuando además de hidrólisis hay oxidación se forma la alina. Ambos compuestos se acumulan naturalmente durante el almacenamiento del ajo. Cuando el ajo es procesado, la alinasa convierte a la alina en alicina; ésta a su vez da origen a otros compuestos.

Los constituyentes adicionales de ajo intacto incluyen los siguientes: glicósidos esteroideos (Matsuura et al., 1988), lectinas (Kaku et al., 1992), prostaglandinas, fructana, pectina, aceite esencial, adenosina, vitaminas: B-1, B-2, B-6, C y E, biotina, ácido nicotínico, ácidos grasos, glicolípidos, fosfolípidos, antocianinas, flavonoides y aminoácidos esenciales (Fenwick y Hanley, 1985).

Cuando el ajo es atacado por microbios, aplastado, cortado o masticado, o cuando es deshidratado, pulverizado y entonces expuesto al agua, la enzima vacuolar alinasa, convierte a la alina en alicina (un líquido incoloro, aceitoso, que comprende 70-80% de los tiosulfatos). La alicina se descompone a sulfuros, incluyendo dialilsulfuros (DAS), dialildisulfuros (DADS), dialiltrisulfuros, metil-alil-disulfuro, metil-alil-trisulfuro, 2-vinil-1,3-ditiína, 3-vinil-1,2-ditiína (Fenwick y Hanley, 1985) E- y Z-ajoeno (Block et al., 1984) (Fig. 8).

5.2.4.2. EFECTOS BENÉFICOS DEL AJO

El consumo de ajo se ha relacionado con un amplio espectro de efectos que benefician la salud de los humanos. En varias culturas, el ajo se ha empleado como: afrodisiaco, antipirético, diurético, expectorante, sedante, tratamiento para el asma y la bronquitis, y para estimular el crecimiento del cabello; pero, no hay estudios que soporten estos efectos atribuidos al ajo.

Reportes en farmacopeas y documentos de medicina tradicional han indicado que el ajo se emplea en el tratamiento de: infecciones en el tracto respiratorio y urinario, condiciones reumáticas, parásitos y dispepsia (WHO, 2003).

En la tabla 3 se presentan algunas de las actividades del ajo que han sido estudiadas los últimos 25 años.

Sin embargo, los datos clínicos únicamente respaldan que el ajo es un coadyuvante en: el tratamiento de la hiperlipidemia, la prevención de cambios vasculares ateroscleróticos y la hipertensión (WHO, 2003).

Tabla 3. Actividades biológicas del ajo

Actividad biológica	Autores	Año
El ajo presenta actividad antitrombótica	Block	1985
El ajo modula síntesis de prostanoïdes	Belman et al.	1989
	Dimitrov y Bennink	1997
El ajo posee potente acción antioxidante	Yang et al.	1993
	Wei y Lau	1998
El ajo estimula respuesta inmune	Reeve et al.	1993
El consumo de ajo previene cáncer gástrico y de colón	Steinmetz et al.	1994
El ajo disminuye el colesterol en sangre y tiene efecto cardioprotector	Neil y Sigali	1994
El ajo reduce la presión por aumento de NO*	Al-Qattan et al.	2006

5.2.4.3. EFECTOS ADVERSOS DEL AJO

El ajo se ha usado tradicionalmente como un condimento y con propósitos medicinales, es común saber que el consumo excesivo de ajo causa problemas. Desde 1932 hay reportes que revelan los siguientes efectos adversos asociados con el ajo fresco y el polvo de ajo: 1) olor del ajo en el aliento y la piel (Mader, 1990); 2) desórdenes del estómago y diarrea (Caporaso et al., 1983; Desai et al., 1990; Nakagawa et al., 1980); 3) disminución de calcio en suero (Miyamoto, 1938; Shashikanth et al., 1986); 4) anemia (Katsunuma, 1932; Kuzutani, 1934; Nakagawa et al., 1980); 5) asma bronquial (Lybarger et al., 1982; Von Kirsten y Meister, 1985); 6) dermatitis por contacto (Burden et al., 1994; Garty, 1993; Lembo et al., 1991; McFadden et al., 1992; Mitchell, 1980; Parish et al., 1987); 7) inhibición de espermatogénesis (Dixit y Joshi, 1982; Qian et al., 1986); y 8) reacciones alérgicas ocasionales (Siegers, 1992) (Amagase et al., 2001).

5.2.4.4. PREPARACIONES DE AJO

El ajo se puede encontrar en diferentes presentaciones: fresco, en polvo, aceite esencial, macerado de aceite de ajo, jugo, extractos acuosos o alcohólicos, extracto envejecido y productos de ajo sin olor. En el mercado, hay docenas de marcas de productos de ajo. En la tabla 4 se presentan las características principales de los productos de ajo más populares en EUA (Amagase, 2006).

Se sabe que los procesos de extracción aumentan la potencia y la biodisponibilidad de varios productos crudos y eliminan las características indeseables y tóxicas. Los compuestos irritantes, ácidos y oxidantes en el ajo crudo, tales como la alicina, pueden ser eliminados y modificados por la extracción con alcohol, vino, leche, vinagre o salsa de soya antes de usarse como terapéutico. Un proceso de extracción apropiado puede eliminar los compuestos indeseables mientras que conserva sólo los activos (Amagase, 2006).

5.2.4.5. EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO (EAE)

El EAE es un producto sin olor resultado de la prolongada extracción del ajo fresco a temperatura ambiente. Para obtener el EAE, el ajo completo o en rebanadas se deja reposar en una solución extractora de etanol al 20%, por un período de 6-20 meses. Durante este proceso de envejecimiento, los compuestos olorosos, ásperos e irritantes del ajo se convierten naturalmente en compuestos de azufre estables y seguros. Después de la separación de la solución, el extracto es concentrado y usado. El extracto en polvo también está disponible (Amagase et al., 2001).

Tabla 4. Productos de ajo disponibles comercialmente

Producto	Principales compuestos y características
Aceite esencial de ajo	1% de compuestos de azufre solubles en aceite (DAS, DADS, etc.) 99% de aceite vegetal No está bien estandarizado No hay datos de seguridad
Macerados oleosos de ajo	Ditiínas, ajoeno, sulfuros, cantidades residuales de alina y otros compuestos del ajo No está bien estandarizado No hay datos de seguridad
Polvo de ajo	Alina y una pequeña cantidad de componentes azufrados solubles en aceite No está bien estandarizado No hay datos de seguridad Los resultados inconsistentes respecto al colesterol
Extracto de ajo envejecido	SAC, SAMC, saponinas, etc. Estandarizado con SAC Pequeñas cantidades de compuestos de azufre solubles en aceite Seguridad bien establecidas Apoyado por más de 400 artículos

5.2.4.5.1. COMPONENTES DEL EAE

El EAE contiene derivados de alil-aminoácidos solubles en agua, alil sulfuros liposolubles estables, flavonoides, saponinas y macro- y micronutrientes esenciales (Amagase, 1998). El EAE carece de alicina.

La SAC y la S-alilmercaptocisteína (SAMC) se producen durante el proceso de envejecimiento, estos compuestos dan al EAE una mayor actividad antioxidante que el ajo fresco y otros derivados del ajo (Imai et al., 1994).

Los compuestos liposolubles en el EAE incluyen dialil sulfuro (DAS), trialil sulfuro, dialil disulfuro (DADS), dialil polisulfuros y otros (Amagase, 1998; Amagase y Milner, 1993). Estos compuestos presentan efectos antioxidantes (Awazu y Horie, 1997; Horie et al., 1989 y 1992).

Otros antioxidantes en EAE incluyen compuestos fenólicos, notablemente alixina, cuyo grupo hidroxilo fenólico confiere actividad antioxidante (Ide y Lau, 1997), N-fructosil glutamato, N-fructosil arginina (O'Brien y Gillies, 1998) y Se, así como compuestos organoazufrados (Borek, 2001).

5.2.4.5.2. EAE COMO ANTIOXIDANTE

La variedad de antioxidantes en el EAE, que protegen contra el daño oxidante causante de enfermedad (Amagase, 1997; Horie et al., 1992; Ide y Lau, 1997; Wei y Lau, 1998; Yamasaki et al., 1991), pueden actuar por los siguientes mecanismos (Amagase et al., 1996; Borek 1993 y 1997):

- Atrapando ERO e inhibiendo la lipoperoxidación
- Incrementando el GSH
- Incrementando las enzimas atrapadoras

El EAE presenta otras actividades biológicas como se indica en la tabla 5:

Tabla 5. Algunas de las actividades biológicas de EAE y sus componentes

Actividad biológica	Autores	Año
El EAE suprime la síntesis de prostaglandinas	Chung et al.	1986
La SAC y la SAMC inhiben la toxicidad hepática inducida por tetracloruro de carbono y acetaminofén	Nakagawa et al.	1988
El EAE presenta efectos radioprotectores	Lau	1989

El EAE previene la formación de TBARS durante la lipoperoxidación de microsomas de hígado de rata	Horie et al.	1989
El EAE y la SAC disminuyen niveles de tromboxano B2 y factor 4 en plasma en modelos hipercolesterolémicos	Qureshi et al.	1990
El EAE aumenta GSH en células de tejido hepático y mamario normal	Liu et al.	1992
El EAE reduce el riesgo de cáncer inducido químicamente	Borek	1993
El EAE previene del daño inducido por ERO en los procesos de enfermedad y envejecimiento	Gutteridge	1993
La SAC inhibe aductos de DNA en células mamarias	Amagase y Milner	1993
El EAE y la SAC disminuyen la producción de TBARS inducidas por H ₂ O ₂	Yamasaki et al.	1994
La SAC, la SAMC y los dialil polisulfuros presentan acción atrapadora de radicales que aumenta con el número de átomos de azufre	Imai et al.	1994
El EAE previene la lipoperoxidación inducida por doxorubicina	Kojima et al. Awazu y Horie	1994 1997
La SAC disminuye el colesterol	Yeh y Yeh	1994
El EAE, la SAC, la SAMC y la alina presentan efecto atrapador de H ₂ O ₂	Ide et al.	1996
El EAE previene los cambios atróficos en la parte frontal del cerebro, favorece el aprendizaje y la memoria	Nishiyama et al. Moriguchi et al.	1996 1997
El EAE y la SAC disminuyen la producción de ERO e inhiben daño cerebral por isquemia-reperfusión en ratas	Numagami et al.	1996
El EAE inhibe la agregación plaquetaria	Steiner	1996
Los DAS protegen a ratas contra el daño inducido por acetaminofén y la elevación de LDH en suero	Hu et al.	1996
El EAE y la SAC atrapan ERO, inhiben oxidación de LDL y el daño a células endoteliales por LDL oxidadas	Ide y Lau	1997
El EAE protege a células endoteliales del daño inducido por ERO	Efendy et al.	1997
El EAE atrapa ¹ O ₂ y [•] OH producidos por luz UV	Borek	1997
El EAE aumenta el GSH, SOD, GPx y CAT en células	Geng y Lau	1997

El EAE y la SAC inhiben activación de NF- κ B inducida por TNF- α y H ₂ O ₂ en células T humanas	Geng et al.	1997
El EAE reduce la formación de N-nitrosomorfolina <i>in vitro</i>	Dion et al.	1997
El EAE previene la pérdida de la deformidad de los eritrocitos	Moriguchi et al.	1998, 2001
El EAE inhibe la formación de lipoperóxidos, incrementa GPx y otras enzimas atrapadoras de ERO	Wei y Lau	1998
La N-fructosil-arginina y la N-fructosil-glutamato presentan efecto antioxidante	O'Brien y Gillies	1998
El EAE inhibe lipoperoxidación en células hepáticas expuestas a fenobarbital y 3,4-bromobenceno	Wang et al.	1998
El EAE atrapador de radicales libres	Pietta y Simonetti	1998
El EAE previene la hemólisis y disminuye flexibilidad de los eritrocitos causado por lipoperoxidación	Amagase et al.	2000
El EAE activa la cNOS	Morihara et al.	2002
El EAE inhibe síntesis de colesterol	Lee y Yeh	2003
El EAE previene y retrasa aterosclerosis	Rahman y Lowe	2006
La SAC presenta efecto renoprotector y antihipertensivo en ratas nefroctomizadas	Cruz et al.	2007
La SAC previene la insuficiencia hepática aguda inducida por tetracloruro de carbono en ratas	Kodai et al.	2007
El EAE y la SAC previenen la formación de productos finales de glicación	Ahmad et al.	2007
La SAC protege contra el estrés oxidante en un modelo de Parkinson en ratones	Rojas et al.	2010
El EAE inhibe la producción de O ₂ ^{•-}	Morihara et al.	2011

5.2.4.5.3. SEGURIDAD DEL EAE

El EAE tiene un amplio rango de efectividad basado en estudios clínicos. El EAE disminuye el colesterol en un rango de dosis de ~1-7.2 g/d, plasma en humanos (Steiner y Lin, 1994). Se ha demostrado que de 1.8 g a 10 g/d de EAE son

efectivos en el reforzamiento de la respuesta inmune (Abdullah et al., 1989; Amagase, 2006; Kandil et al., 1988).

Se han realizado estudios toxicológicos y clínicos de EAE sin efectos adversos. La seguridad del EAE ha sido bien establecida por los siguientes estudios: 1) pruebas de toxicidad aguda y subaguda (Nakagawa et al., 1984a y b); 2) prueba de toxicidad crónica (Sumiyoshi et al., 1984); 3) pruebas de mutagenicidad (Yoshida et al., 1984); 4) pruebas de toxicidad general (Kanezawa et al., 1984; Nakagawa et al., 1980); 5) pruebas de teratogenicidad; 6) pruebas de toxicidad realizados por la FDA en los EUA; y 7) estudios clínicos realizados en >1000 sujetos (Hasegawa et al., 1983; Kawashima et al., 1989; Steiner et al., 1996).

El EAE no muestra interacciones con varios medicamentos, incluyendo la warfarina (Macan et al., 2006; Rosenfield et al., 2000), la aspirina, las estatinas (Budoff et al., 2004), la adrimicina/doxisorubicina (Kojima et al., 1994), el 5-fluoruracilo/metotrexato (Horie et al., 1999 y 2001) y otros (Amagase, 2006).

5.2.4.6. S-ALIL-L-CISTEINA (SAC)

La SAC es uno de los compuestos organoazufrados de ajo solubles en agua y su concentración aumenta a lo largo de la extracción en medio acuoso. La concentración de SAC en sangre y otros parámetros farmacocinéticos están asociados con la dosis de SAC administrada oralmente en estudios con animales. Se ha encontrado N-acetil-S-alil-L-cisteina en una concentración significativa como un metabolito de SAC en la orina. Esto indica que SAC puede ser transformada en un metabolito N-acetilado por N-acetiltransferasa en el cuerpo. La biodisponibilidad de SAC es 103 % en ratón, 98.2% en ratas y 87.2% en perros. La SAC es una de las sustancias activas en las preparaciones de ajo y contribuye a la actividad biológica del ajo.

La SAC tiene 30 veces menos toxicidad que la alicina y los DADS (Imada, 1990).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 190-230 g de peso corporal, éstas se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM (CU), con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h y con libre acceso a la comida y al agua.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Cada grupo estuvo formado, al menos, por tres animales en cada protocolo. Los animales se sacrificaron por decapitación, 24 horas después del tratamiento y se obtuvieron los riñones y la sangre.

Para establecer el modelo de IRA-MC, se realizaron protocolos con una previa sensibilización de la función renal para que se observara un mayor efecto del medio de contraste.

Las ratas se anestesiaron con xilacina y ketamina vía intraperitoneal (i.p.). Posteriormente, la indometacina, el L-NAME y el medio de contraste se administraron por vía intravenosa (i.v.).

2.1. MODELO DE IRA-MC EN RATAS.

- a.** Primero se establecieron las dosis de la indometacina y del L-NAME. La indometacina se administró a dosis de 10-25 mg/kg i.v. y 15 min después, el L-NAME se administró a dosis de 10-25 mg/kg i.v.
- b.** Posteriormente, se estableció la dosis del medio de contraste (diatrizoato). Se administró la indometacina (13 mg/kg i.v.), 15 min después el L-NAME (13 mg/kg i.v.) y 15 min después se administró el medio de contraste a diferentes dosis (2-4 g de iodo/kg i.v.).

2.2. EFECTO DEL EAE EN EL MODELO DE IRA-MC. Para evaluar el efecto del EAE en el modelo de IRA-MC, el EAE se administró a dosis de 0.5, 1, 1.2, 1.5, 2 ml/kg i.p.; 30 min después se administró la indometacina (13 mg/kg i.v.), 15 min después el L-NAME (13 mg/kg i.v.) y 15 min después el medio de contraste (4 g de iodo/kg i.v.).

2.3. EFECTO DE LA SAC EN EL MODELO DE IRA-MC. Para evaluar el efecto de la SAC en el modelo de IRA-MC, la SAC se administró a dosis de 200, 300, 400 y 500 mg/kg i.p. Después de 30 min, se administró la indometacina (13 mg/kg i.v.), 15 min después el L-NAME (13 mg/kg i.v.) y 15 min después el medio de contraste (4 g de iodo/kg i.v.).

Únicamente se evaluó el efecto del EAE y de la SAC debido a que no contamos con los recursos para conseguir algún otro compuesto antioxidante. Además, el medio de contraste MD-76R™ ya no está a la venta.

3. MUESTRAS

3.1. Suero. Al momento del sacrificio, la sangre de las ratas se recolectó en tubos de vidrio, posteriormente se separó el coágulo, las muestras se centrifugaron a 855 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, en una centrifuga EBA20 (Hettich). El suero se separó en alícuotas en tubos eppendorf que se guardaron en congelación hasta su uso.

3.2. Riñón. Los riñones de cada rata se disectaron, se cortaron transversalmente y se colocaron en papel aluminio para guardarlos a -20°C hasta su uso.

3.3. Homogenado para determinaciones enzimáticas. El homogenado se preparó de riñón completo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 y tritón 1%, se utilizó un homogenador Polytron PT 10-35 durante 20 s. Se utilizó una dilución de tejido en amortiguador 1:4 (p/v). Los homogenados se centrifugaron en una microcentrífuga Beckman a 15,000 x g durante 1 h a 4°C.

3.4. Cuantificación de proteínas. La determinación de proteínas se realizó por el método colorimétrico de Lowry y colaboradores (1951). Se hicieron diluciones de los homogenados 1:50 y a la par se preparó una curva patrón con albúmina sérica bovina (0-0.5 mg/ml). A cada tubo se le adicionaron 500 µl de la solución C [A:B, 50:1 (A: tartrato de sodio y potasio 0.02%, NaOH 0.4%, Na₂CO₃ 2%; B: CuSO₄ 0.5%)], se agitó y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 50 µl de solución D (Folin:agua, 1:1), se agitó en vortex G-560 (Scientific Industries) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbencia se determinó en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman) a 660 nm. La curva se utilizó para calcular la concentración de cada muestra analizada. Los resultados se expresaron como mg de proteína/ml.

3.5. Cortes histológicos. Un corte transversal de riñón se fijó en 1 ml de formalina. Posteriormente, se deshidrataron con 3 lavados de etanol absoluto de 1 h cada uno. A continuación, los cortes se trataron con 3 lavados de xilol y luego tres lavados de parafina fundida a 60°C. Las muestras se colocaron por separado en moldes para su inclusión en parafina. Una vez fría la parafina, el bloque se desmoldó y se realizaron cortes de 4 µm con un micrótopo de rotación Leica RM2145. Previamente se prepararon portaobjetos esmerilados con una solución de γ -metacrilixipropiltrimetoxisilano (silano) al 5% en acetona. Se sumergieron 5 min en dicha solución y se dejaron secar por 12 h. Los cortes se colocaron en los portaobjetos silanizados y se incubaron por 15 min a 60°C. Después de este procedimiento las muestras están listas para realizar una tinción de hematoxilina y eosina (H&E).

4. EVALUACIÓN DEL DAÑO RENAL

4.1. Función glomerular

4.1.1. Creatinina en suero (SCr). La creatinina presente en suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé, basado en la generación de un complejo anaranjado al reaccionar la creatinina con el ácido

pícrico en solución alcalina. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra.

La lectura del espectro se ajustó a cero con agua destilada a 492 nm. En una celda se adicionaron 400 µl de la mezcla de reacción (R1 [ácido pícrico]: R2 [hidróxido de sodio], 1:1), se leyó a los 0, 30, 60 y 90 s. A continuación, se adicionaron 40 µl del estándar de creatinina de 2 mg/dl y se leyó a los tiempos antes mencionados. Posteriormente, las muestras se leyeron adicionando 40 µl de suero y 400 µl de mezcla de reacción, las lecturas se realizaron a los tiempos mencionados. La concentración de creatinina presente en las muestras se obtuvo calculando el cociente de las diferencias de absorbencia de la muestra (la lectura 90 s menos la lectura 30 s) entre las diferencias del estándar por la concentración del estándar. Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dl.

4.1.2. Nitrógeno de urea en el suero sanguíneo (BUN). La concentración de urea en el suero se determinó por el método de la ureasa/glutamato deshidrogenasa. En el cual la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea presente en la muestra en amoníaco y anhídrido carbónico. Los iones amonio formados se incorporan al α -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa en oxidación paralela de NADH a NAD⁺. La disminución en la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada.

La lectura del espectro se ajustó a cero con agua destilada a 340 nm. En una celda se adicionaron 400 µl de la mezcla de reacción (R2 [ureasa, GLDH, NADH]:R1 [Tris, α -cetoglutarato]; 1:4), se leyó a los 0, 30, 60 y 90 s. A continuación, se adicionaron 4 µl del estándar de urea de 50 mg/dl y se leyó a los tiempos antes mencionados. Posteriormente para las muestras, se adicionaron 4 µl de suero y 400 µl de mezcla de reacción, se leyeron a los tiempos mencionados. La concentración de nitrógeno de urea presente en las muestras se obtuvo calculando el cociente de las diferencias de absorbencia de la muestra (la lectura 90 s menos la lectura 30 s) entre las diferencias del estándar por la

concentración del estándar y dividiendo entre 2.14 (factor que se refiere al número de átomos de nitrógeno en la molécula de urea). Los resultados se expresan en mg/dl.

4.2. Daño tubular

4.2.1. Actividad de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en homogenado. La actividad de la enzima NAG se determinó a través de un ensayo basado en la conversión del *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -D-glucosaminido en *p*-nitrofenol, que a pH ácido es incoloro y se encuentra protonado. Al alcalinizar el medio, el *p*-nitrofenol pasa de su forma protonada a su forma aniónica la cual absorbe a 405 nm. Se utilizaron 25 μ l de homogenado diluido 1:80 en amortiguador de citratos, se agregaron 187.5 μ l de amortiguador de citratos 50 mM pH 4.4 y posteriormente se adicionaron 62.5 μ l de sustrato *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -D-glucosaminido 30 mM (Jung et al., 1991). Para evaluar la absorbencia basal de cada muestra se preparó un blanco sin sustrato y para evaluar la conversión espontánea del sustrato se preparó un blanco sin muestra de homogenado. Todos los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C durante 15 min. La reacción se detuvo con 275 μ l de Na₂CO₃ 0.2 M pH 10.4, las muestras se leyeron a 405 nm. Las absorbencias de la forma aniónica del *p*-nitrofenol se interpolaron en una curva de calibración de *p*-nitrofenol en un intervalo de 5 a 175 nmol. Los resultados se expresaron como unidades (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un μ mol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo.

4.2.2. Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). La actividad de LDH en suero se determinó con un método cinético acoplado a la oxidación de NADH. La LDH cataliza la reducción del piruvato por el NADH. La velocidad de disminución en la concentración de NADH en el medio, es proporcional a la concentración catalítica de LDH en la muestra.

La lectura del espectro se ajustó a cero con agua destilada a 340 nm. En una celda se colocaron 90 μ l de mezcla de reacción (R1 imidazol, piruvato: R2 NADH)

y 3 µl de suero. Se incubó durante 1 min. Se leyó la absorbancia cada minuto durante 3 min. Para determinar la concentración de LDH, se calculó el promedio de las diferencias de absorbancia por minuto y se multiplicó por 4925. Los resultados se expresaron como U de LDH/l. Una U es la cantidad de enzima que convierte 1 µmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar.

4.2.3. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E). Los cortes histológicos se desparafinaron con tres lavados de 5 min de xilol y se rehidrataron con 3 lavados de 5 min de alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina durante 5 min, se lavaron con agua y con una solución de HCl 1% en etanol a 70%. Luego, la hematoxilina se viró con Li_2CO_3 al 0.1% y se tiñeron con eosina durante 15 s y se realizaron lavados breves con etanol absoluto. Finalmente, los cortes ya teñidos se deshidrataron pasándolos por soluciones de etanol y xilol; se montaron, para su observación, con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos. Esta tinción se realiza para observar las estructuras del tejido, la hematoxilina tiñe de morado los núcleos y la eosina tiñe todas las proteínas del citoplasma y de membranas de rosa.

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

5. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDANTE

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

El contenido de carbonilos en las proteínas oxidadas se determinó en 100 μ l de los homogenados con inhibidores de proteasas, los cuales se incubaron con 120 μ l de sulfato de estreptomicina al 10% durante la noche para eliminar los ácidos nucleicos.

Carbonilos. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron y se tomó una alícuota de 150 μ l de sobrenadante y se depositó en tubos eppendorf. A estos, se agregaron 600 μ l de DNPH 10 mM disuelta en HCl 2.5 M y se agitaron. Las muestras se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad. A continuación, las muestras se trataron con 600 μ l de TCA al 20% (con la finalidad de precipitar las proteínas y lavar) y se incubaron durante 10 min a 4°C. Después, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 2, 375 x g y 4°C. Se realizó otro lavado con TCA al 10% bajo las condiciones mencionadas. Los lípidos y la DNPH libre se extrajeron a través de tres lavados con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1). Los precipitados se resuspendieron en 1 ml de guanidina-HCl 6 M. Finalmente, las muestras se leyeron a 280 y 375 nm.

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

6. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL RIÑÓN

6.1. Actividad de enzimas

6.1.1. Actividad de la SOD total. La actividad de SOD total se determinó por la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) (Oberley y Spitz, 1984). Se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración de 168 U/l y una mezcla de reacción que contenía en concentración final: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μ M, albúmina sérica bovina 0.006% y Na_2CO_3 49 mM. Se colocaron 326 μ l de la mezcla de reacción en dos tubos de ensayo y se mantuvieron a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 66 μ l de homogenado renal diluido 1:1200 con amortiguador de fosfatos e inmediatamente después la reacción se inició con 5 μ l de la solución de xantina oxidasa. Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero en lugar de la solución de xantina oxidasa se adicionó amortiguador de fosfatos. De manera simultánea se preparó un blanco de comparación el cual contenía xantina oxidasa pero sin el homogenado. Todos los tubos se incubaron 1 h, al término de este tiempo se adicionaron 132 μ l de CuCl_2 0.8 mM y la absorbencia se leyó a 560 nm. Los datos se expresaron como U de SOD/mg de proteína. Una U de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

6.1.2. Actividad de la CAT. Se utilizó el método de Aebi (1984). En una celda de cuarzo se adicionaron 25 μ l de homogenado diluido 1:30 en amortiguador de fosfato 10 mM pH 7. Se mezcló con 725 μ l de H_2O_2 7.7 mM en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7. Se midió el cambio de absorbencia a 240 nm cada 15 s durante 30 s, periodo en el cual el H_2O_2 sigue una cinética de primer orden (Aebi, 1984). De acuerdo a Aebi (1984), se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $k=(1/t)(2.3 \times \log[A_1]/[A_2])$ donde t= intervalo medido, A_1 y A_2 son las absorbencias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 .

6.1.3. Actividad de la GPx. Se empleó el método de Lawrence y Burk (1976). El homogenado se diluyó 2:25 con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7. Se tomaron 30 µl de esta solución y se mezclaron con 240 µl de mezcla de reacción: amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 U de glutatión reductasa/ml y GSH 1 mM. Se preparó un blanco con la mezcla de reacción añadiendo agua destilada en lugar de la dilución de la muestra. El blanco, o la muestra, se incubaron 5 min a temperatura ambiente, se le adicionaron 30 µl de H₂O₂ 0.25 mM e inmediatamente después se leyó la absorbencia a 340 nm cada minuto durante 3 min. Los datos se expresaron como U/mg de proteína. Una U se define como los µmoles de NADPH oxidado en un minuto.

6.2. Cuantificación de enzimas

6.2.1. Inmuno ensayo tipo “western blot”. Se utilizaron 20 µg de proteína total del homogenado para realizar electroforesis desnaturalizantes en gel de acrilamida (PAGE-SDS) según el método de Laemmli (1970) utilizando una cámara de electroforesis Hoefer miniVE de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido) durante 3 h a 120 V. Posteriormente, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa de Hybond ECL, con una cámara de transferencia Hoefer miniVE durante 1 h a 400 mA y 4°C.

Para el inmuno ensayo tipo “western blot” las membranas se bloquearon con leche en polvo (Svelty) al 5% en Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 100 mM y Tween-20 al 0.1% (PBS-T) pH 7.4 durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Después se realizaron dos lavados de 10 min con PBS-T. Las membranas se incubaron con agitación durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos comerciales anti-CuZn-SOD (1:10,000), anti-Mn-SOD (1:30,000), anti-CAT (1:1,000) y toda la noche con anti-HO-1 (1:7,000). A continuación, las membranas se lavaron dos veces con PBS-T durante 10 min, se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo acoplada a peroxidasa de rabano diluido

1:10,000 (SODs), 1:3,000 (CAT) y 1:15,000 (HO-1) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, las membranas se observaron utilizando un sistema de detección por quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se expusieron por 20 min a una placa para radiografía Hyperfilm y luego se realizó el revelado de la placa.

Finalmente se realizó una densitometría a cada una de las placas utilizando el programa ImageJ y los resultados obtenidos se normalizaron, considerando como el 1 las muestras de los grupos control.

7. MATERIALES

El EAE fue de la marca Kyolic[®] elaborado por Wakunaga of America Co. (Mission Viejo, CA, EUA). La SAC fue sintetizada por la Dra. Perla Maldonado en el laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. El p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminido, la xantina oxidasa, la xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el glutati3n reducido, la glutati3n reductasa, el NADPH, el mesilato de deferoxamina (DFO), el 1cido tiobarbit3rico (TBA), el tetrametoxipropano (TMPO) la acrilamida, el p-nitrofenol, la bisacrilamida, el tris base, el duodecil sulfato de sodio, la glicina, el azul de bromofenol, el N^o-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), el TEMED, la indometacina, el 1cido tricloroac3tico (TCA), el glicerol, el tween-20, la formalina y la alb3mina bovina fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El KH₂PO₄, el Na₂HPO₄, el EDTANa₂, el cloruro c3prico (CuCl₂), el sulfato de amonio, el H₂O₂, la piridina, el butanol, el HCl, el NaCl, el metanol y el NaH₂PO₄ fueron de Mallinckrodt Baker (Xalostoc, Edo. de M3xico, M3xico). El medio de contraste empleado (MD-76R[™] diatrizoato meglumina y diatrizoato de sodio) fue de Mallinckrodt Inc. (St. Louis, MO, EUA). La xilacina y la ketamina fueron de Pisa Agropecuaria (Tula, Hidalgo, M3xico). Los anticuerpos que se emplearon en el ensayo tipo “western blot” contra Mn-SOD, CuZn-SOD y HO-1 fueron de

StressGen (Victoria, BC, Canadá) y contra CAT fueron Calbiochem (San Diego, CA, EUA). Para las determinaciones de BUN, SCr y LDH se emplearon estuches de Spinreact (Sant Esteve de Bas, Girona, España). Para la detección del inmunoensayo tipo “western blot” se utilizó un estuche de quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EUA). La membrana de nitrocelulosa Hybond ECL y la placa Hiperfilm fueron de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentaron como el promedio \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Los datos se analizaron con el programa Prism 3 (Graph Pad, San Diego, EUA) mediante ANOVA y comparaciones múltiples de Dunnett o Bonferroni, según el tipo de datos. Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

VII. RESULTADOS

Para establecer el modelo de IRA-MC y evaluar el efecto de los antioxidantes estudiados, utilizamos dos marcadores de la función glomerular: nitrógeno de urea en sangre (BUN) y creatinina en suero (SCr).

1. MODELO DE IRA-MC EN RATAS

1.1. Sensibilización de la función renal

Se probaron diferentes dosis de indometacina y L-NAME 10, 13, 15 y 20 mg/kg vía i.v. Se observó que todas las dosis de indometacina y L-NAME provocaron un aumento en los niveles de BUN y que sólo las dosis de 15 y 20 mg/kg elevaron los valores de SCr (Fig. 9A y B).

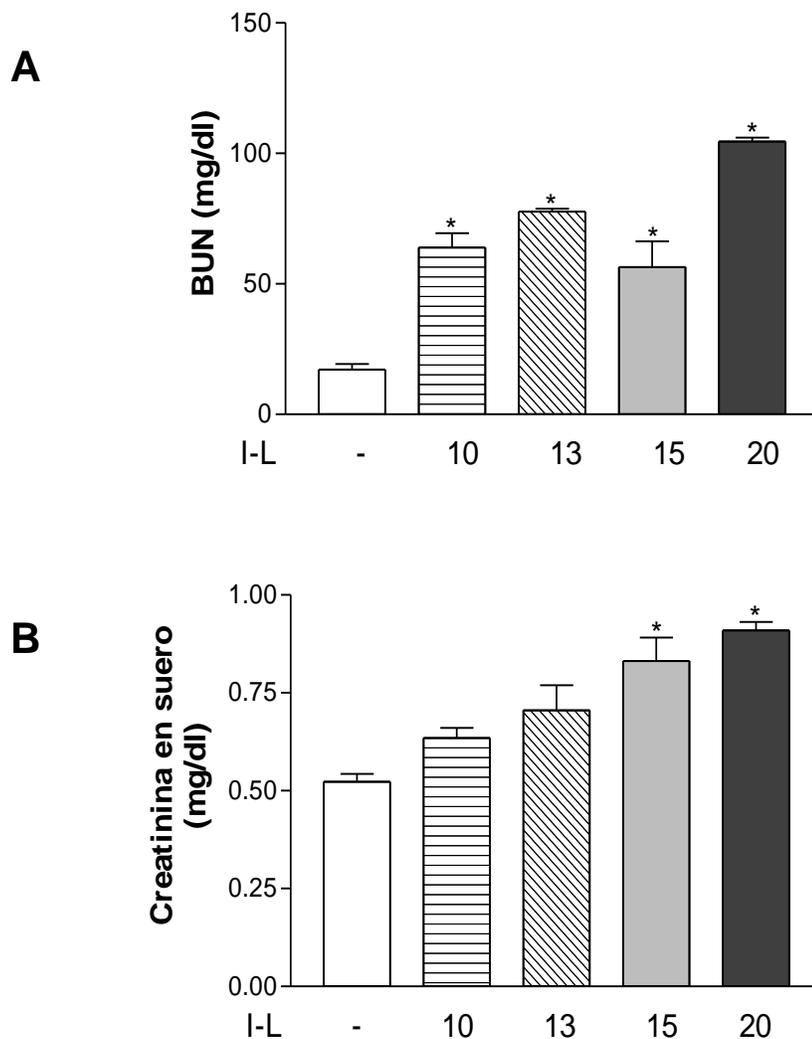


Figura 9. Establecimiento del modelo de sensibilización del riñón con indometacina y L-NAME. **A)** BUN y **B)** SCr. I-L: indometacina y L-NAME dosis de 10, 13, 15 y 20 mg/kg. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento).

La dosis de 13 mg/kg de indometacina y L-NAME se eligió para sensibilizar al riñón ya que esta dosis no elevó la concentración de SCr. La administración de indometacina y L-NAME se realizó con el propósito de hacer sensible al riñón no de causarle daño. Además, las ratas que se inyectaron con las dosis de 15 y 20 mg/kg presentaron un estado físico muy deteriorado.

1.2. Efecto de la administración de diatrizoato a ratas con función renal sensibilizada

Una vez determinada la dosis de indometacina y L-NAME (13 mg/kg), el medio de contraste diatrizoato (DIA) se administró a dosis de 2, 3 y 4 g iodo/kg. Aunque la administración de DIA presentó una tendencia a aumentar los valores de BUN y SCr dependiendo de la dosis, sólo la dosis de 4 g iodo/kg elevó el valor de BUN y de SCr (Fig. 10A y B).

Dicho aumento fue mayor que el que se presentó sólo con la sensibilización; el valor de SCr correspondió a lo que se ha reportado para que se considere IRA-MC (un aumento de 25% en la SCr dentro de las 48 h posteriores a la administración del medio de contraste).

Así, el modelo de IRA causada por DIA (IRA-DIA) en ratas Wistar se estableció de la siguiente manera: indometacina 13 mg/kg + L-NAME 13 mg/kg + DIA 4 g iodo/kg.

2. EFECTO DEL EAE EN EL MODELO DE IRA-DIA

Para evaluar el efecto del EAE en el modelo de IRA-DIA se emplearon diferentes dosis de EAE: 0.5, 1.0, 1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg, las cuales se administraron 30 min antes que la indometacina, el L-NAME y el DIA. Se observó que sólo las dosis de 1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE protegieron parcialmente del aumento BUN. En tanto que las dosis de 1-2 ml/kg protegieron parcialmente del aumento de SCr (Fig. 11A y B).

3. EFECTO DE LA SAC EN EL MODELO DE IRA-DIA

Para evaluar el efecto del SAC se emplearon diferentes dosis: 200, 300, 400 y 500 mg/kg vía i.p., las cuales se administraron 30 minutos antes que la indometacina, el L-NAME y el DIA.

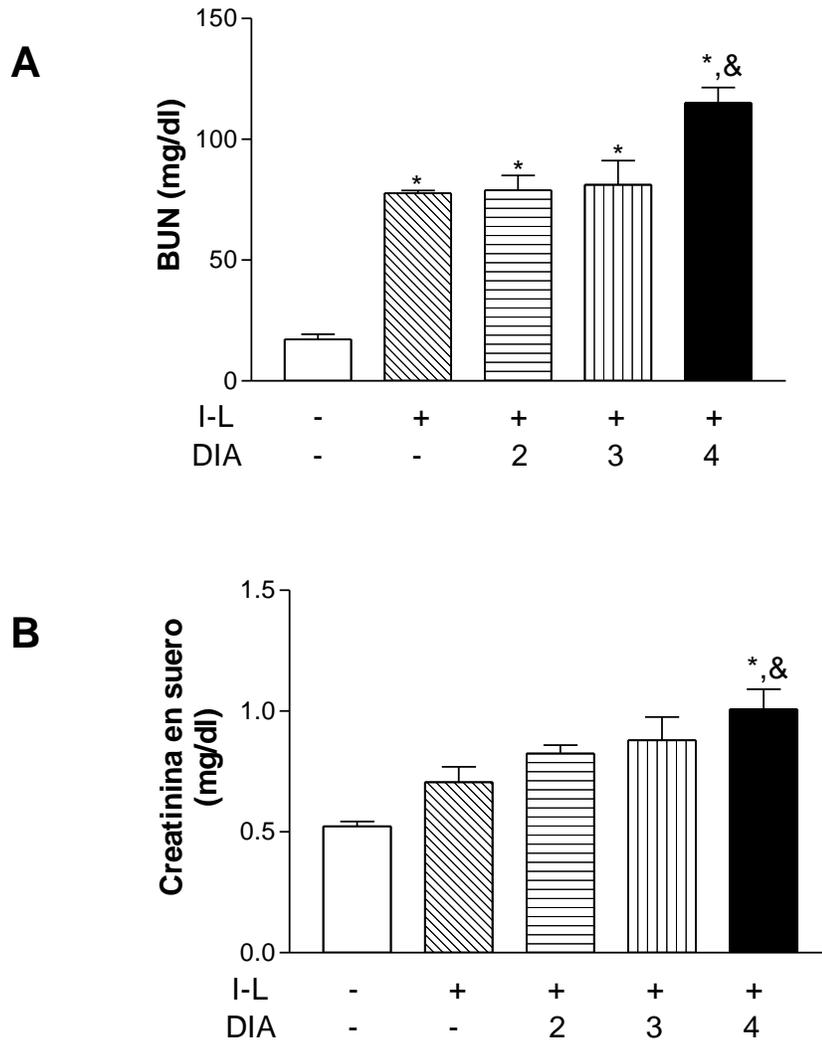


Figura 10. Establecimiento de daño con diatrizoato en ratas sensibilizadas con indometacina y L-NAME. **A)** BUN y **B)** SCr. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato dosis de 2, 3 y 4 g de iodo/kg. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento), & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

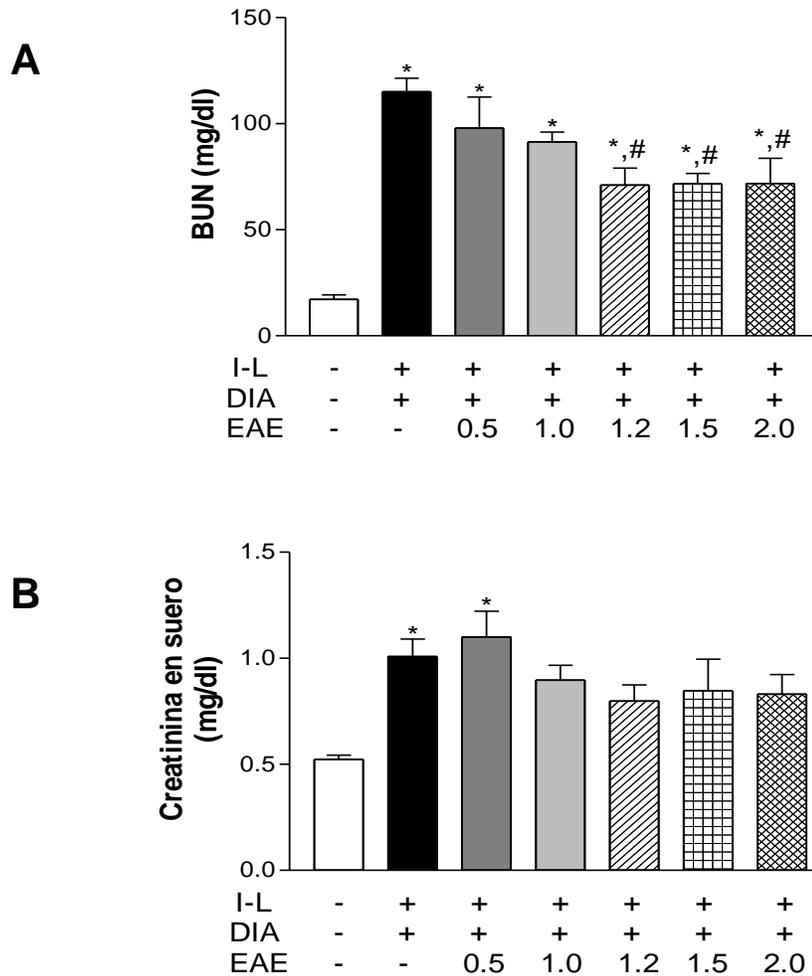


Figura 11. Evaluación del efecto del EAE en el modelo de IRA-DIA. **A)** BUN y **B)** SCr. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g de iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (0.5, 1, 1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA).

Se observó que las dosis de 300 y 400 mg/kg de SAC protegieron parcialmente del aumento de BUN y de SCr. La dosis de 500 mg/kg de SAC protegió totalmente del aumento de BUN y protegió parcialmente del aumento de SCr (Fig. 12A y B).

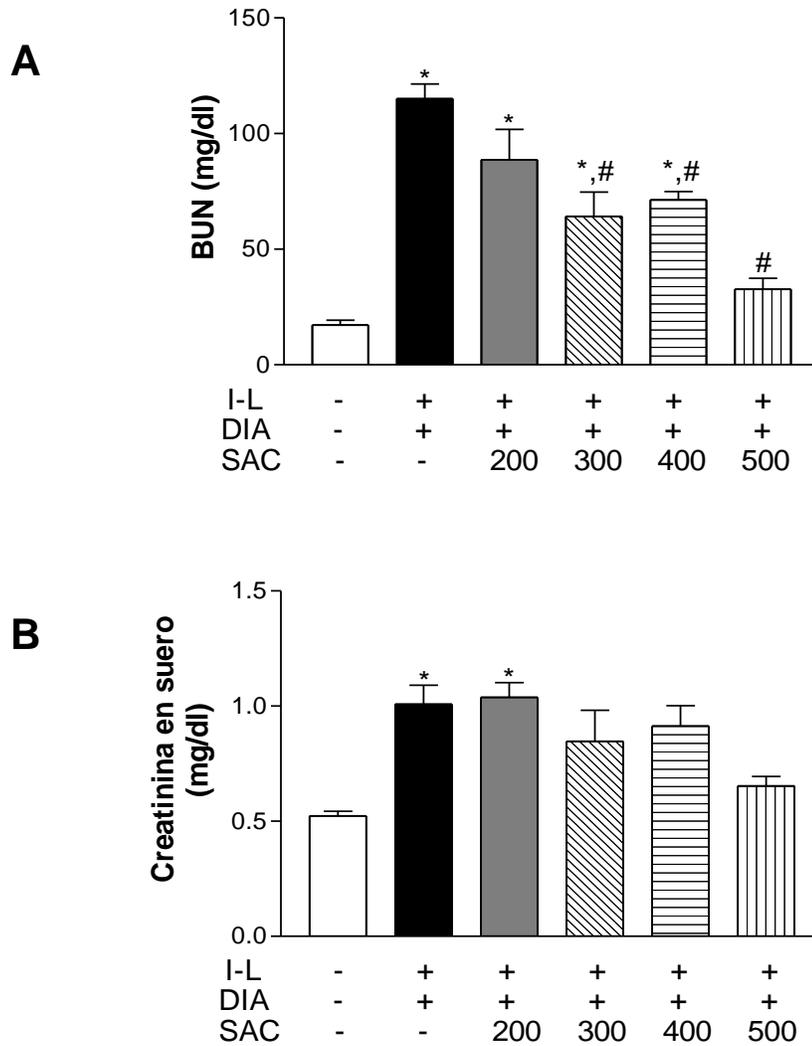


Figura 12. Evaluación del efecto de la SAC en el modelo de IRA-DIA. **A)** BUN y **B)** SCr. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. SAC: S-alil-L-cisteína (200, 300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA).

Una vez determinadas las dosis de EAE y de SAC que protegieron parcialmente del daño glomerular en el modelo de IRA-DIA, se evaluó el efecto de las dosis de 1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE y la dosis de 500 mg/kg de SAC en las ratas con función renal sensibilizada (administradas con indometacina y L-NAME) y en las ratas sanas. Debido a que contábamos con una cantidad limitada de SAC, sólo se evaluó la dosis más alta.

4. EFECTO DEL EAE Y LA SAC EN RATAS CON FUNCIÓN RENAL SENSIBILIZADA

Se observó que las dosis de 1.2 y 2.0 ml/kg de EAE no protegieron de la elevación de BUN a las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME. Mientras que las dosis de 1.5 ml/kg de EAE y 500 mg/kg de SAC las protegieron parcialmente del aumento de BUN (Fig. 13A). No hubo diferencia entre los valores de SCr de las ratas control y de las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, tampoco hubo diferencia con las dosis de EAE y SAC evaluadas (Fig. 13B).

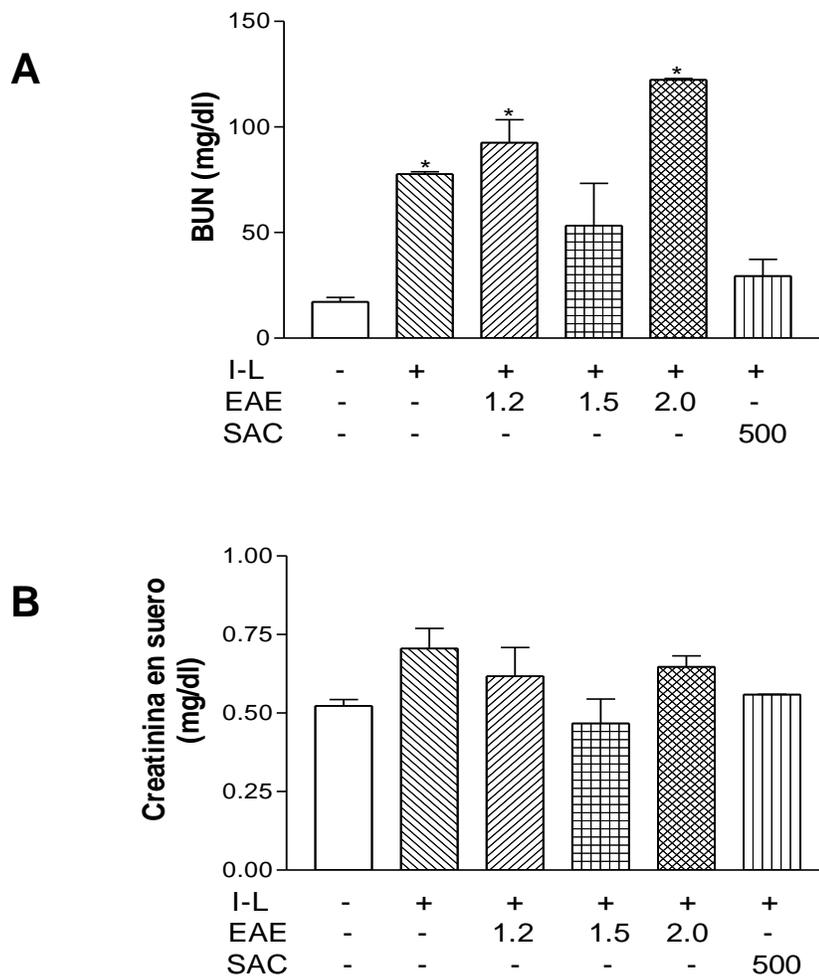


Figura 13. Evaluación del efecto del EAE y de la SAC en ratas inyectadas con indometacina y L-NAME. **A)** BUN y **B)** SCr. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg). SAC: S-alil-L-cisteína (500 mg/kg). Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

5. EFECTO DEL EAE Y LA SAC EN RATAS SANAS

La administración del EAE y SAC a las ratas sanas no provocó diferencia en los niveles de BUN y SCr respecto a las ratas control (Fig. 14A y B).

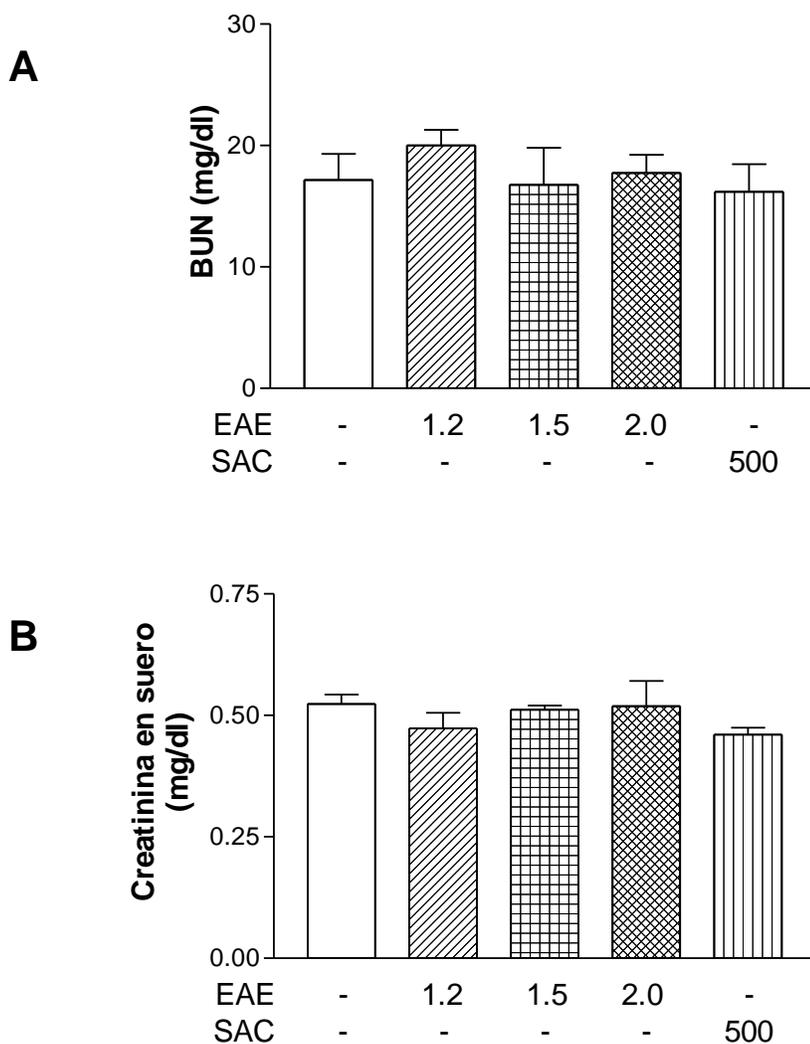


Figura 14. Evaluación del efecto del EAE y de la SAC en ratas sanas. **A)** BUN y **B)** SCr. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg). SAC: S-aliil-L-cisteína (500 mg/kg). Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento).

Posteriormente se evaluó el efecto de los antioxidantes (a las dosis que presentaron protección parcial: 1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg EAE y 500 mg/kg de SAC)

sobre otros marcadores de daño renal, marcadores de estrés oxidante y enzimas antioxidantes.

6. EVALUACIÓN DE DAÑO TUBULAR

6.1. Actividad de NAG en homogenado renal

La actividad de la NAG en homogenado de riñón se determinó como marcador de daño tubular. Se observó que la actividad de NAG en el homogenado renal de las ratas con IRA-DIA fue menor que en las ratas control, lo cual indicó que en este modelo de IRA-DIA se presentó daño tubular. Las dosis de 1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE protegieron parcialmente a las ratas con IRA-DIA, mientras que las dosis de 300, 400 y 500 mg/kg de SAC no las protegieron (Fig. 15A).

En el caso de las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, se observó que las dosis de 1.2 y 2.0 ml/kg de EAE protegieron parcialmente del daño tubular; mientras que la dosis de 1.5 ml/kg de EAE lo hizo totalmente. La dosis de 500 mg/kg de SAC no protegió del daño tubular a las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME (Fig. 15B).

Las ratas sanas administradas con EAE no presentaron diferencias en la actividad de NAG respecto a las ratas control, las ratas inyectadas con SAC presentaron actividad de NAG menor a las ratas control (Fig. 15C).

6.2. Actividad de LDH en suero

La actividad de LDH en suero se determinó como un marcador de lesión renal. Se observó que la actividad de LDH en el modelo de IRA-DIA fue mayor que en las ratas control. La dosis de 1.2 ml/kg de EAE no protegió del aumento de LDH en suero a las ratas con IRA-DIA. Las dosis de 2.0 ml/kg de EAE, 300, 400 y 500 mg/kg de SAC protegieron totalmente del aumento de LDH en suero a las ratas con IRA-DIA (Fig.16A).

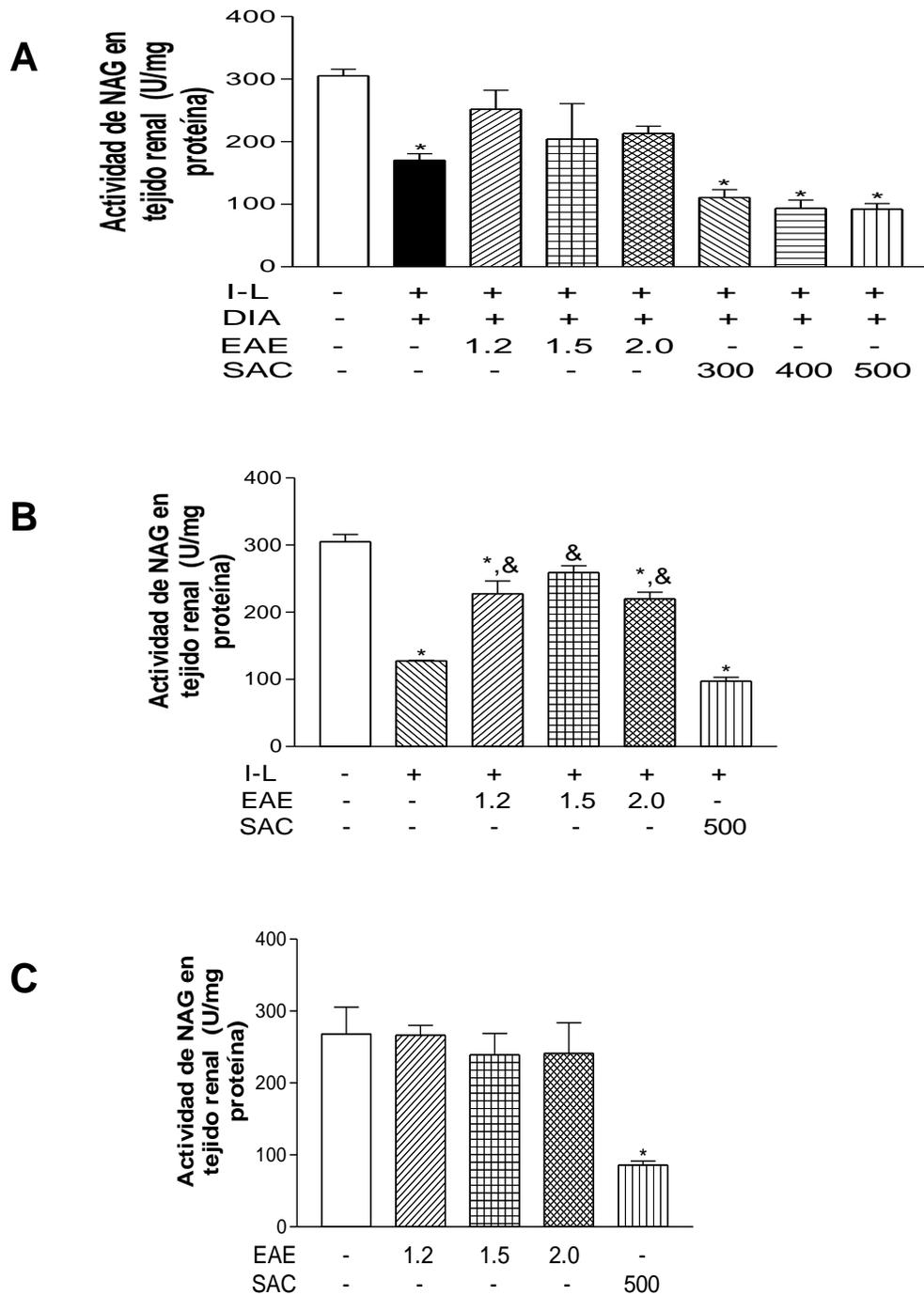


Figura 15. Evaluación de la actividad de la N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio ± EE, * P<0.05 vs control (sin tratamiento); #P<0.05 vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & P<0.05 vs sensibilización renal (I-L).

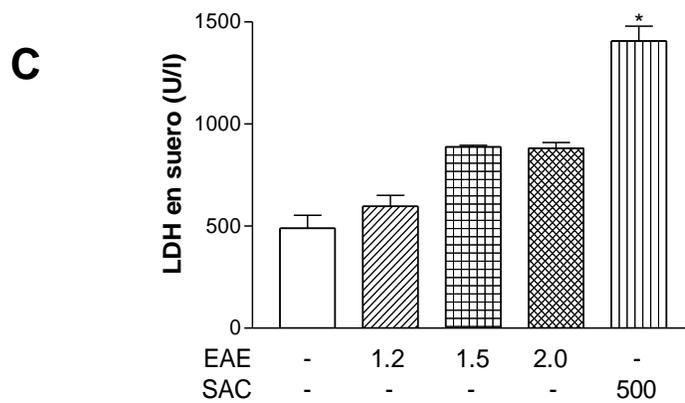
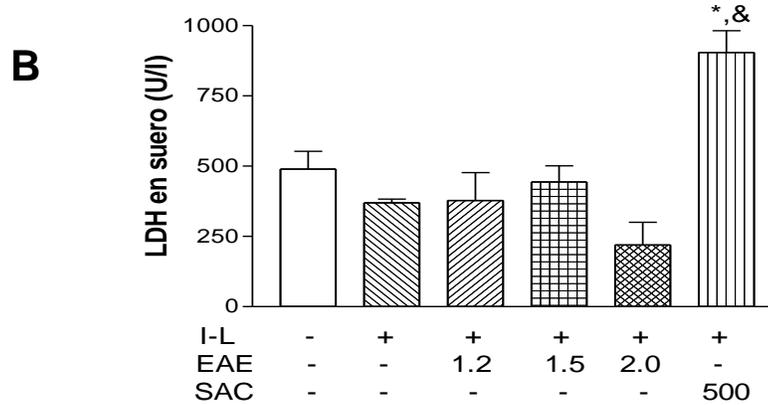
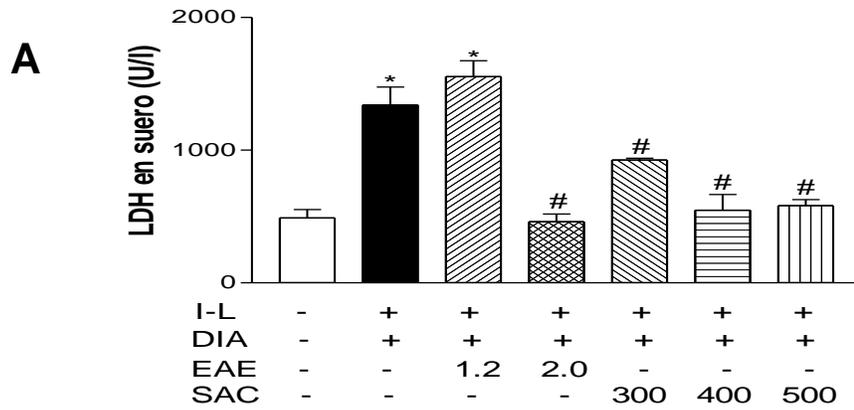


Figura 16. Evaluación de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) en suero. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

La actividad de LDH en suero de las ratas control no fue diferente a la que se presentó en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, ni a la de las ratas inyectadas con EAE (a las dosis de 1.2, 1.5 y 2.0 mg/kg), indometacina y L-NAME. Sólo la dosis de 500 mg/kg de SAC en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME provocó un aumento en la actividad de LDH en suero (Fig. 16B).

En las ratas sanas, la administración de EAE (1.2, 1.5 y 2.0 mg/kg) no aumentó significativamente la actividad de LDH en suero; sólo la administración de 500 mg/kg de SAC provocó un aumento de la actividad de LDH en suero (Fig. 16C).

6.3. Análisis histológico

Se realizó un estudio histológico de cortes trasversales de riñón. Se analizaron muestras de todos los grupos y se muestran fotografías de los grupos más representativos. Los grupos control de la corteza (Fig. 17A) y de la médula externa (Fig. 18A); de EAE de la corteza (Fig. 17C) y de la médula externa (Fig. 18C); de SAC de la corteza (Fig. 17D) y de la médula externa (Fig. 18D), de indometacina y L-NAME y sus combinaciones presentaron estructura normal. Los riñones de las ratas con IRA-DIA presentaron vacuolas en los túbulos de la corteza (Fig. 17B) y cilindros de la médula externa (Fig. 18B). La administración de EAE y SAC disminuyó la presencia de vacuolas (Fig. 17E y F) y de cilindros (Fig. 18E y F) ocasionados por la IRA-DIA. La dosis de 1.2 ml/kg de EAE (Fig. 17 y 18E) presentó el efecto mayor comparado con otras dosis de EAE. Todas las dosis de SAC utilizadas presentaron un efecto semejante al de la dosis de 300 mg/kg (Fig. 17 y 18F).

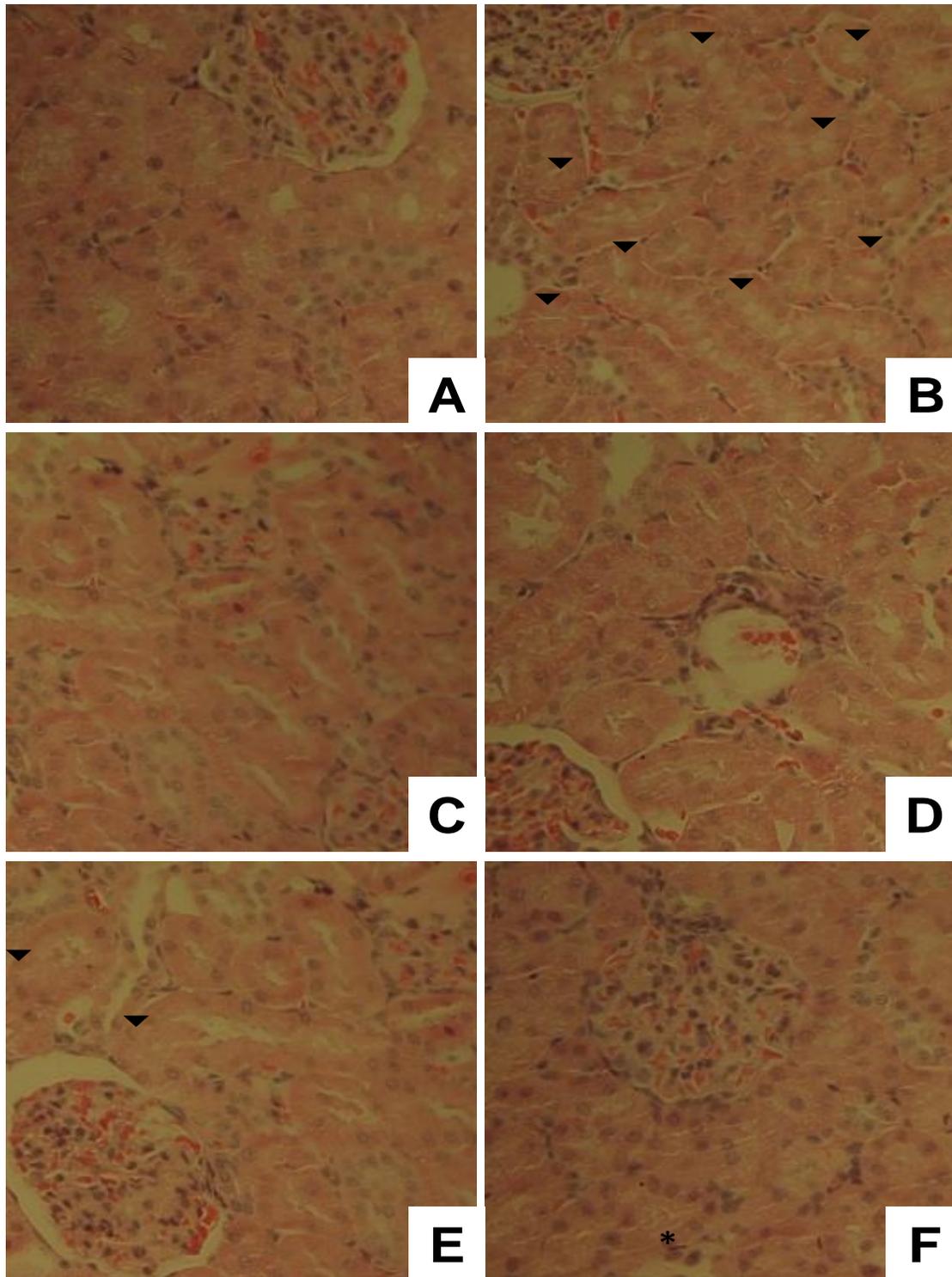


Figura 17. Estudio histológico de la corteza. Tinción de hematoxilina y eosina: **A.** Control. **B.** IRA-DIA (I-L-DIA). **C.** EAE. **D.** SAC. **E.** EAE+IRA-DIA. **F.** SAC+IRA-DIA. Control: sin tratamiento. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA. 400X. Se observan vacuolas (▼).

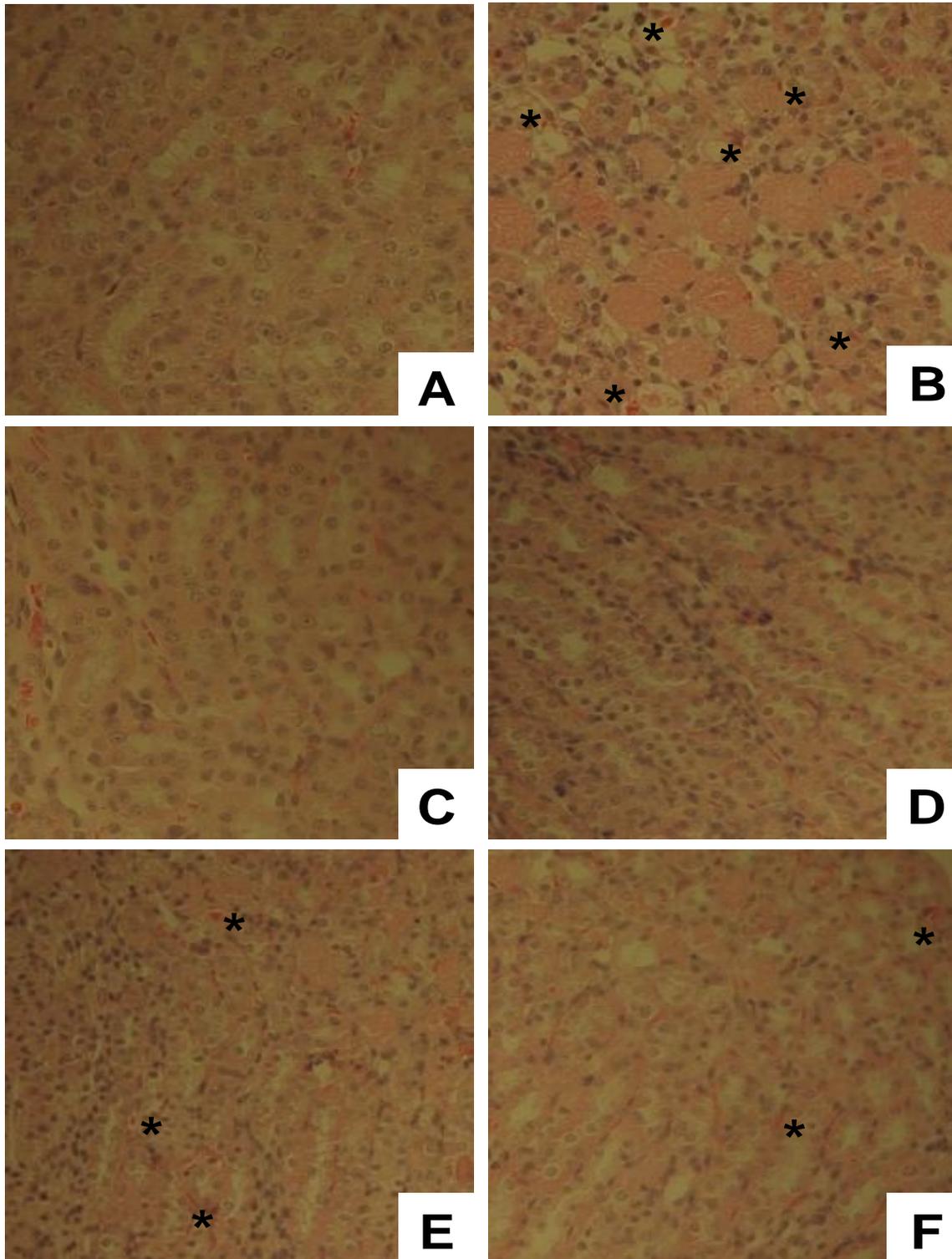


Figura 18. Estudio histológico de la médula externa. Tinción de hematoxilina y eosina: **A.** Control. **B.** IRA-DIA I-L-DIA. **C.** EAE. **D.** SAC. **E.** EAE+IRA-DIA. **F.** SAC+IRA-DIA. Control: sin tratamiento. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. 400X. Se observan cilindros (*).

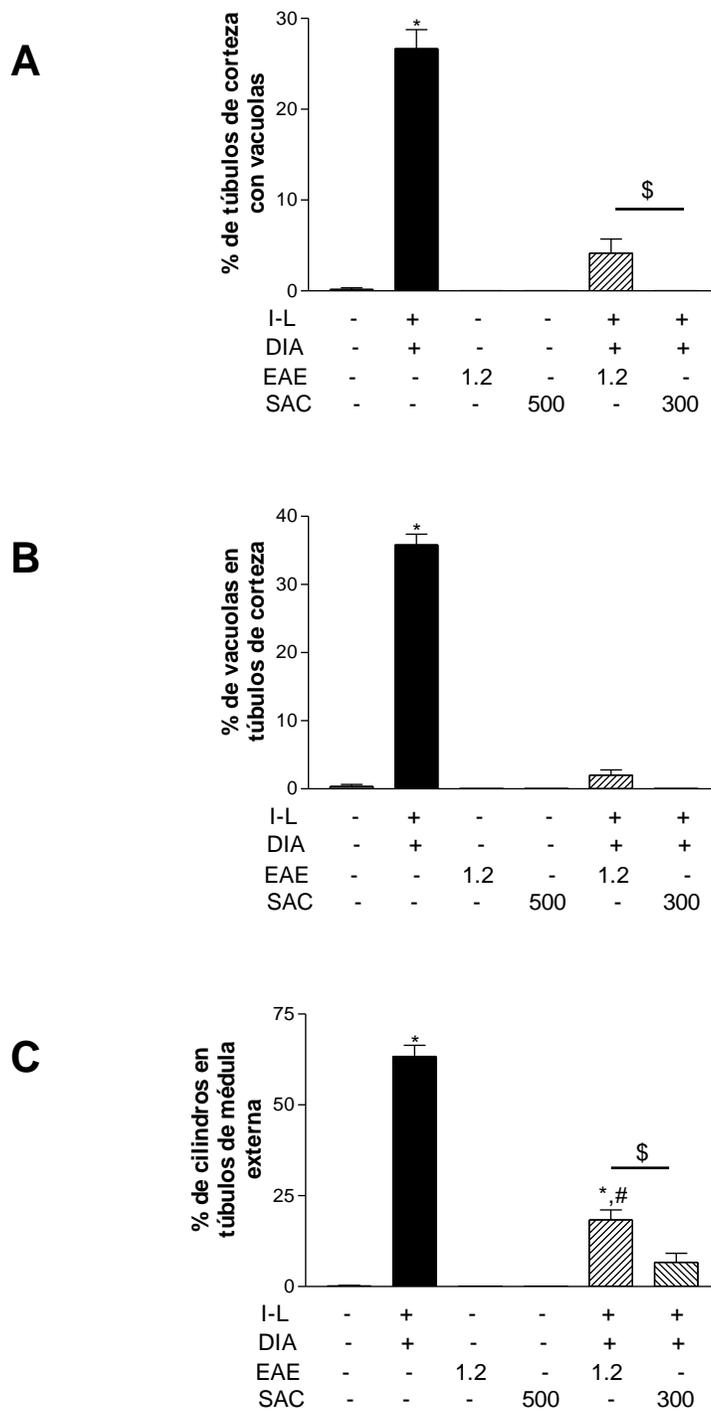


Figura 19. Cuantificación de signos de daño. **A)** Porcentaje de túbulos de corteza con vacuolas. **B)** Porcentaje de vacuolas en túbulos dañados de corteza. **C)** Porcentaje de cilindros en túbulos de médula externa. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); § $P < 0.05$ EAE+IRA-DIA vs SAC+IRA-DIA.

El porcentaje de túbulos con vacuolas fue del 0.17% para el control, mientras que para el grupo de IRA-DIA fue de 26.67%. Las muestras de las ratas inyectadas únicamente con EAE y SAC no presentaron túbulos con vacuolas. Las dosis de 1.2 ml/kg de EAE (4.16%) y de 300 mg/kg de SAC (0%) disminuyeron el porcentaje de túbulos con vacuolas en las ratas con IRA-DIA, aunque la administración de SAC resultó más eficaz (Fig. 19A).

El porcentaje de vacuolas en los túbulos dañados de las ratas control fue de 0.33%, mientras que en las ratas con IRA-DIA se presentó 35.83% de vacuolas en los túbulos dañados. Los controles del EAE y la SAC no presentaron vacuolas. Las dosis de 1.2 ml/kg de EAE (2%) y 300 mg/kg de SAC (0%) disminuyeron el porcentaje de vacuolas en los túbulos dañados que se presentó en las ratas con IRA-DIA. No hubo diferencia entre la administración de EAE y SAC (Fig. 19B).

El porcentaje de cilindros en los túbulos de la médula externa de las ratas control fue de 0.17%, en tanto que para las ratas con IRA-DIA, dicho porcentaje fue de 63.33%. Los controles de los antioxidantes (EAE y SAC) no presentaron cilindros. La dosis de 1.2 ml/kg de EAE (18.33%) disminuyó parcialmente el porcentaje de cilindros en la médula externa que se presentó en las ratas con IRA-DIA; mientras que, la administración de SAC (6.67%) lo disminuyó totalmente (Fig. 19C).

7. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDANTE

7.1. Contenido de carbonilos en homogenado renal

Se determinó el contenido de carbonilos y se encontró que aumentó en las ratas con IRA-DIA. Las dosis de 1.2 y 1.5 ml/kg de EAE protegieron de la oxidación de proteínas a las ratas con IRA-DIA, mientras que la dosis de 2.0 ml/kg las protegió parcialmente. Las dosis de 300, 400 y 500 mg/kg de SAC protegieron totalmente de la oxidación de proteínas a las ratas con IRA-DIA, incluso las dosis de 300 y 400 presentaron un contenido de carbonilos menor al de las ratas control (Fig. 20A).

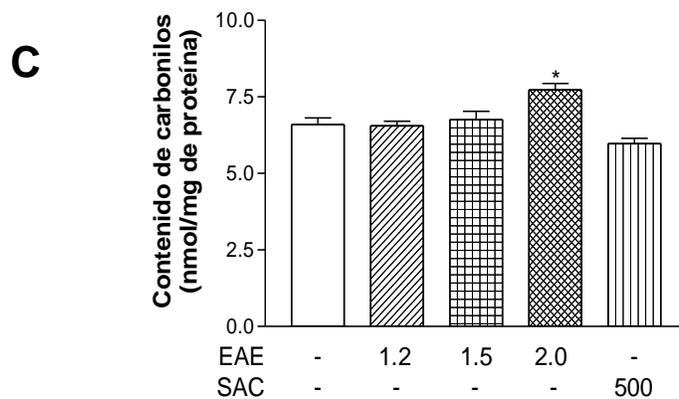
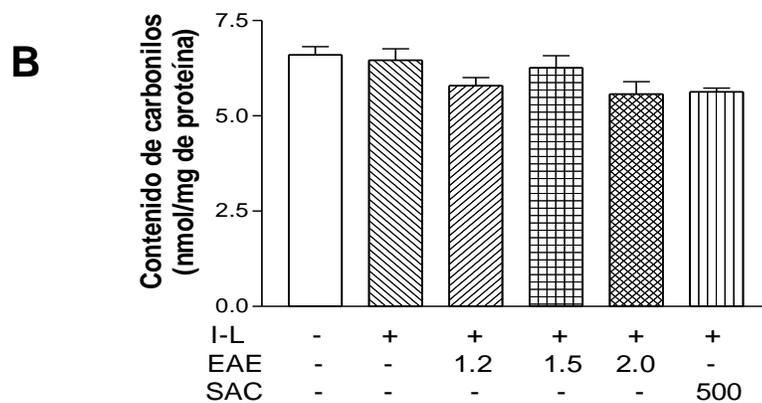
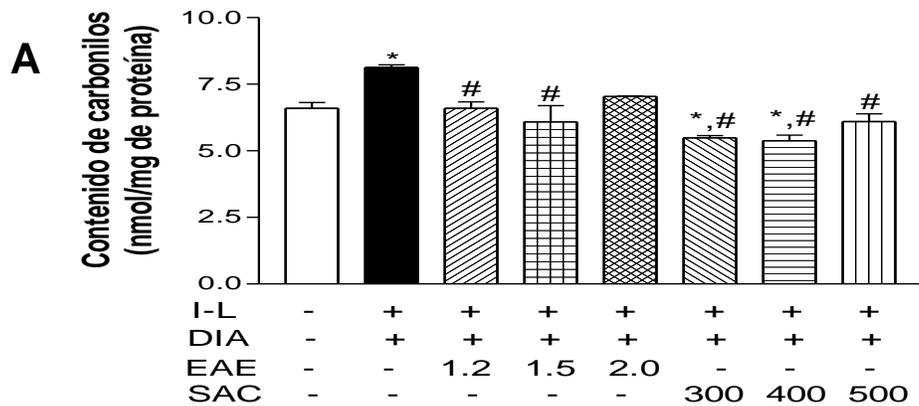


Figura 20. Evaluación del contenido de proteínas oxidadas en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-aliil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

No hubo diferencia entre el contenido de carbonilos en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME y las ratas control. Tampoco hubo diferencias entre el contenido de carbonilos de las ratas control y de las ratas inyectadas con EAE o SAC e indometacina y L-NAME, aunque se presentó una tendencia a disminuir con la administración de los antioxidantes (Fig. 20B).

En las ratas sanas, la administración de 1.2 y 1.5 ml/kg de EAE y 500 mg/kg de SAC no aumentó el contenido de carbonilos respecto al control. Sin embargo, la dosis de 2.0 ml/kg de EAE presentó un aumento en el contenido de carbonilos respecto al control (Fig. 20C).

8. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

8.1. Actividad de la SOD total en homogenado renal

La actividad de la SOD se determinó en homogenado de riñón. Se observó que no hubo diferencia entre la actividad de la SOD en las ratas con IRA-DIA y en las ratas control. La actividad de la SOD en las ratas con IRA-DIA tratadas con EAE no presentó diferencias respecto al control. Las dosis de 300 y 500 mg/kg de SAC disminuyeron la actividad de la SOD en las ratas con IRA-DIA. Mientras que la dosis de 400 mg/kg de SAC no presentó diferencia respecto al control (Fig. 21A).

La actividad de la SOD en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME no fue diferente a la de las ratas control. La actividad de la SOD en las ratas inyectadas con EAE, indometacina y L-NAME no fue diferente a las ratas control; sin embargo, presentó una tendencia a aumentar dependiendo de la dosis. La actividad de la SOD disminuyó en las ratas inyectadas con 500 mg/kg de SAC, indometacina y L-NAME (Fig. 21B).

La actividad de la SOD en las ratas sanas inyectadas con EAE no fue diferente a la que presentaron las ratas control. Mientras que la actividad de la SOD en las ratas sanas disminuyó con la administración de 500 mg/kg de SAC (Fig. 21C).

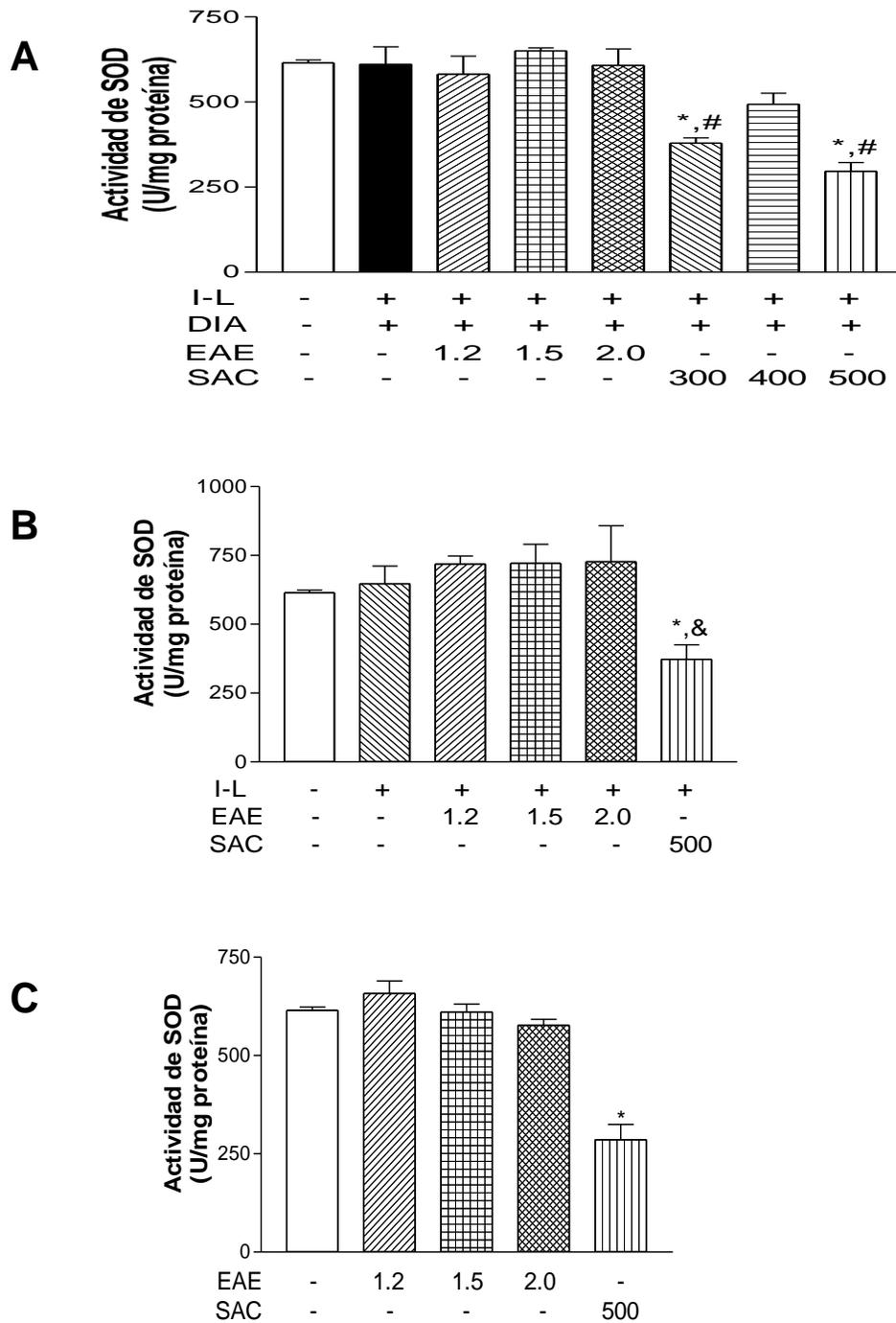


Figura 21. Evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-aliil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

8.2. Actividad de la CAT en homogenado renal

La actividad de la CAT se determinó en homogenado de riñón. Se observó que la actividad de la CAT en las ratas con IRA-DIA tendió a ser menor que en las ratas control, aunque no fueron diferentes. La actividad de la CAT en las ratas con IRA-DIA inyectadas con EAE (1.2 y 2.0 ml/kg) ó SAC (300 y 400 mg/kg) fue mayor que en las ratas con IRA-DIA. La actividad de la CAT en las ratas con IRA-DIA inyectadas con 1.5 ml/kg de EAE ó 500 mg/kg de SAC no fue diferente a la de las ratas control (Fig. 22A).

La actividad de la CAT en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME tendió a ser menor que la actividad en las ratas control, aunque no fueron diferentes. Las dosis de 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE aumentaron la actividad de la CAT en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME. La actividad de CAT en las ratas inyectadas con 500 mg/kg de SAC e indometacina y L-NAME fue mayor que en las ratas control (Fig. 22B).

La actividad de la CAT en las ratas sanas administradas con EAE no fue diferente a la que se presentó en las ratas control. Sólo la dosis de 500 mg/kg de SAC provocó un aumento en la actividad de la CAT respecto a las ratas control (Fig. 22C).

8.3. Actividad de la GPx en homogenado renal

La actividad de la GPx también se determinó en homogenado de riñón. Se observó que la actividad de la GPx aumentó en las ratas con IRA-DIA. Las dosis de EAE aumentaron la actividad de la GPx en las ratas con IRA-DIA, incluso la dosis de 1.2 ml/kg de EAE aumentó la actividad de la GPx respecto a las ratas con IRA-DIA. Las dosis de 300 y 500 mg/kg de SAC no modificaron la actividad de la GPx en las ratas con IRA-DIA respecto a las ratas control. La dosis de 400 mg/kg de SAC presentó un aumento parcial en la actividad de la GPx respecto a las ratas control (Fig. 23A).

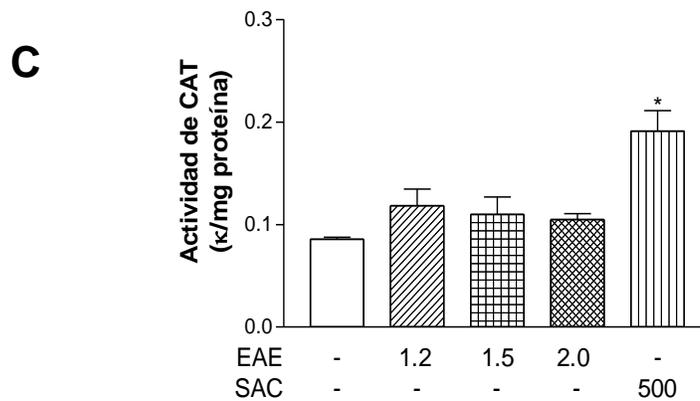
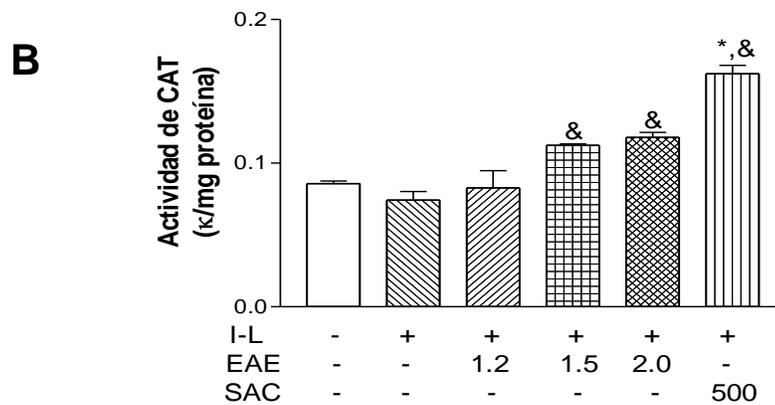
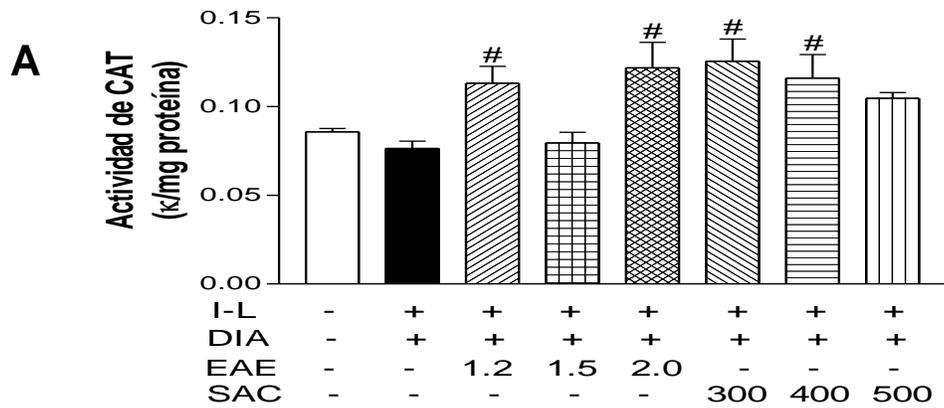


Figura 22. Evaluación de la actividad de la catalasa (CAT) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-aliil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

La administración de indometacina y L-NAME aumentó la actividad de la GPx respecto a las ratas control. Las dosis de 1.2 y 1.5 ml/kg de EAE ó 500 mg/kg de SAC en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, también aumentaron la actividad de la GPx respecto a las ratas control; incluso la dosis de 1.5 ml/kg de EAE presentó mayor actividad de la GPx respecto a las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME (Fig. 23B).

En las ratas sanas la administración de EAE aumentó la actividad de la GPx respecto a las ratas control. La dosis de 500 mg/kg de SAC presentó un ligero aumento en la actividad de la GPx, aunque no hubo diferencia respecto a las ratas control (Fig. 23C).

8.4. Contenido de CuZn-SOD en homogenado renal

La expresión de la CuZn-SOD aumentó en las ratas con IRA-DIA y en aquellas ratas con IRA-DIA inyectadas con EAE o SAC, en las ratas inyectadas con SAC se observaron aumentos de 1-2 veces la expresión de la CuZn-SOD en las ratas control (Fig. 24A).

La expresión de la CuZn-SOD en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME no fue diferente a la de las ratas control, tampoco hubo diferencia en la expresión de la CuZn-SOD en las ratas inyectadas con EAE, indometacina y L-NAME. La expresión de la CuZn-SOD aumentó al triple en las ratas inyectadas con 500 mg/kg de SAC, indometacina y L-NAME (Fig. 24B).

La expresión de la CuZn-SOD aumentó en las ratas sanas que fueron inyectadas con EAE y SAC. La expresión de la CuZn-SOD para la dosis de 1.2 ml/kg de EAE fue 5 veces la de las ratas control, mientras que para las dosis de 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE el aumento fue menos de la mitad de la que presentaron las ratas control. La expresión de la CuZn-SOD para la dosis de 500 mg/kg de SAC fue 3 veces el control (Fig. 24C).

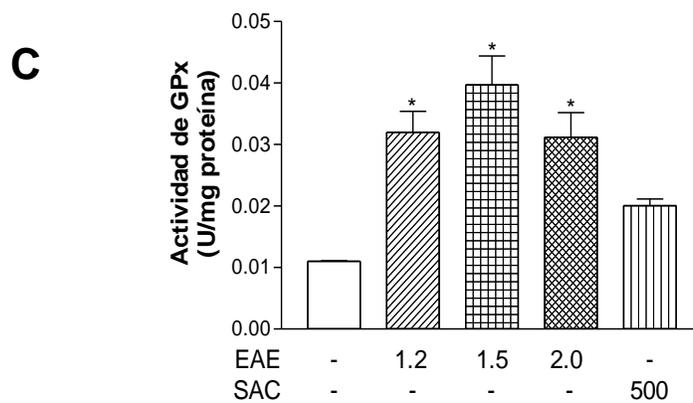
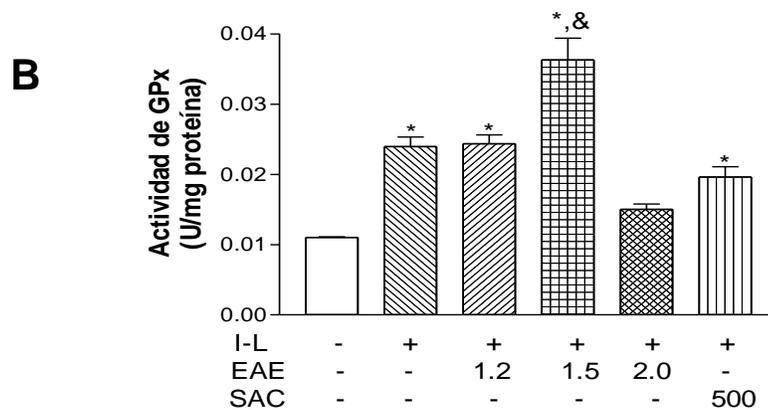
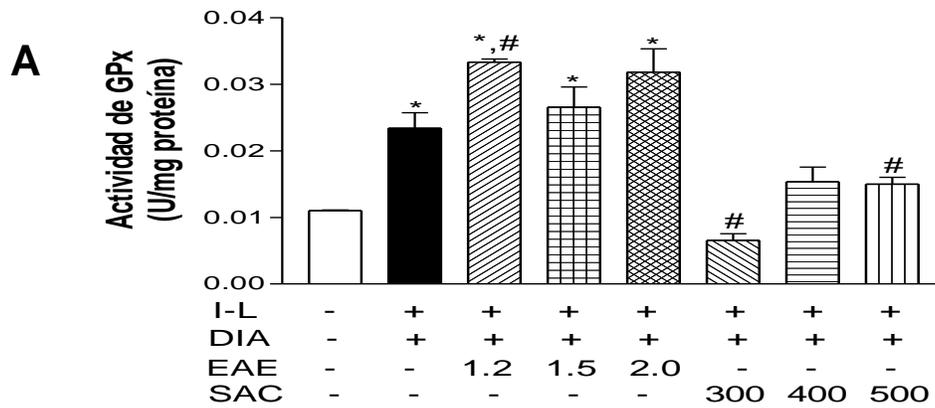


Figura 23. Evaluación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-aliil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

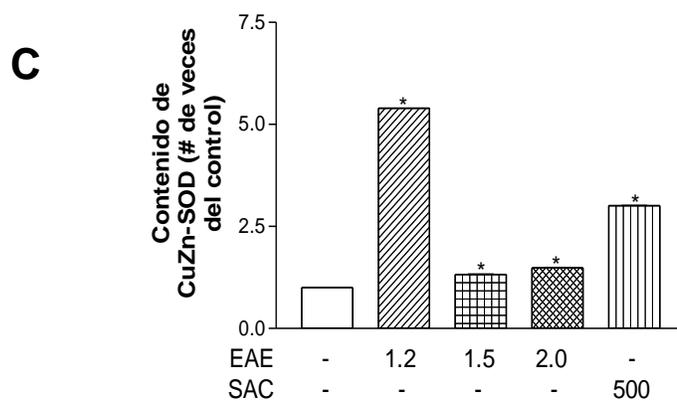
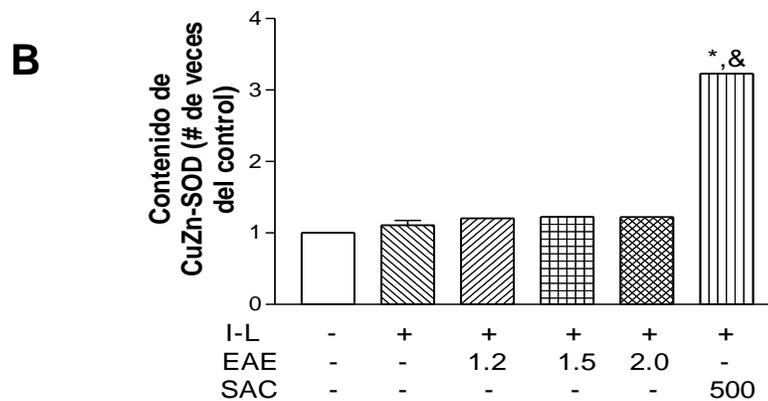
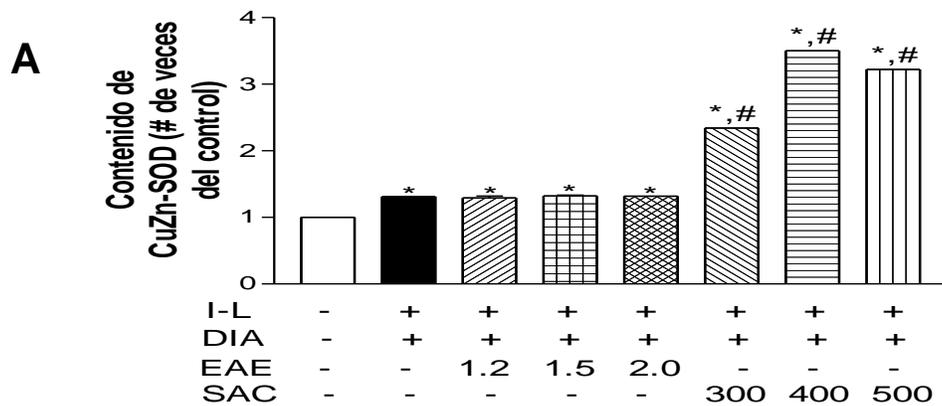


Figura 24. Contenido de superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZn-SOD) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

8.5. Contenido de Mn-SOD en homogenado renal

La expresión de la Mn-SOD en las ratas con IRA-DIA fue mayor que en las ratas control. La expresión de la Mn-SOD también aumentó en las ratas con IRA-DIA inyectadas con EAE o SAC, en todos los casos dicho aumento fue menor a la mitad de la expresión en las ratas control. Las dosis que presentaron mayor expresión de la Mn-SOD fueron 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE y 400 mg/kg de SAC (Fig. 25A).

La expresión de Mn-SOD en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME aumentó respecto a las ratas control. Las ratas inyectadas con EAE, indometacina y L-NAME también presentaron un aumento en la expresión de la Mn-SOD. Las ratas inyectadas con 500 mg/kg de SAC, indometacina y L-NAME presentaron un aumento de casi 0.5 veces la expresión de la Mn-SOD en las ratas control (Fig. 25B).

La expresión de la Mn-SOD en las ratas sanas inyectadas con EAE y SAC aumentó para las dosis de 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE y 500 mg/kg de SAC. En todos los casos dicho aumento fue menor a la mitad de la expresión de la Mn-SOD en las ratas control (Fig. 25C).

8.6. Contenido de CAT en homogenado renal

La expresión de la CAT disminuyó en las ratas con IRA-DIA respecto a las ratas control, también lo hizo en las ratas con IRA-DIA inyectadas con EAE o SAC. Las ratas inyectadas con SAC presentaron un nivel de expresión de CAT incluso menor que el presentado por las ratas con IRA-DIA (Fig. 26A).

La expresión de la CAT disminuyó en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME respecto a las ratas control. La expresión de la CAT en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME no se modificó con la administración del EAE o de la SAC. En las ratas inyectadas con EAE, la expresión de la CAT presentó una ligera tendencia a aumentar al incrementarse la dosis (Fig. 26B).

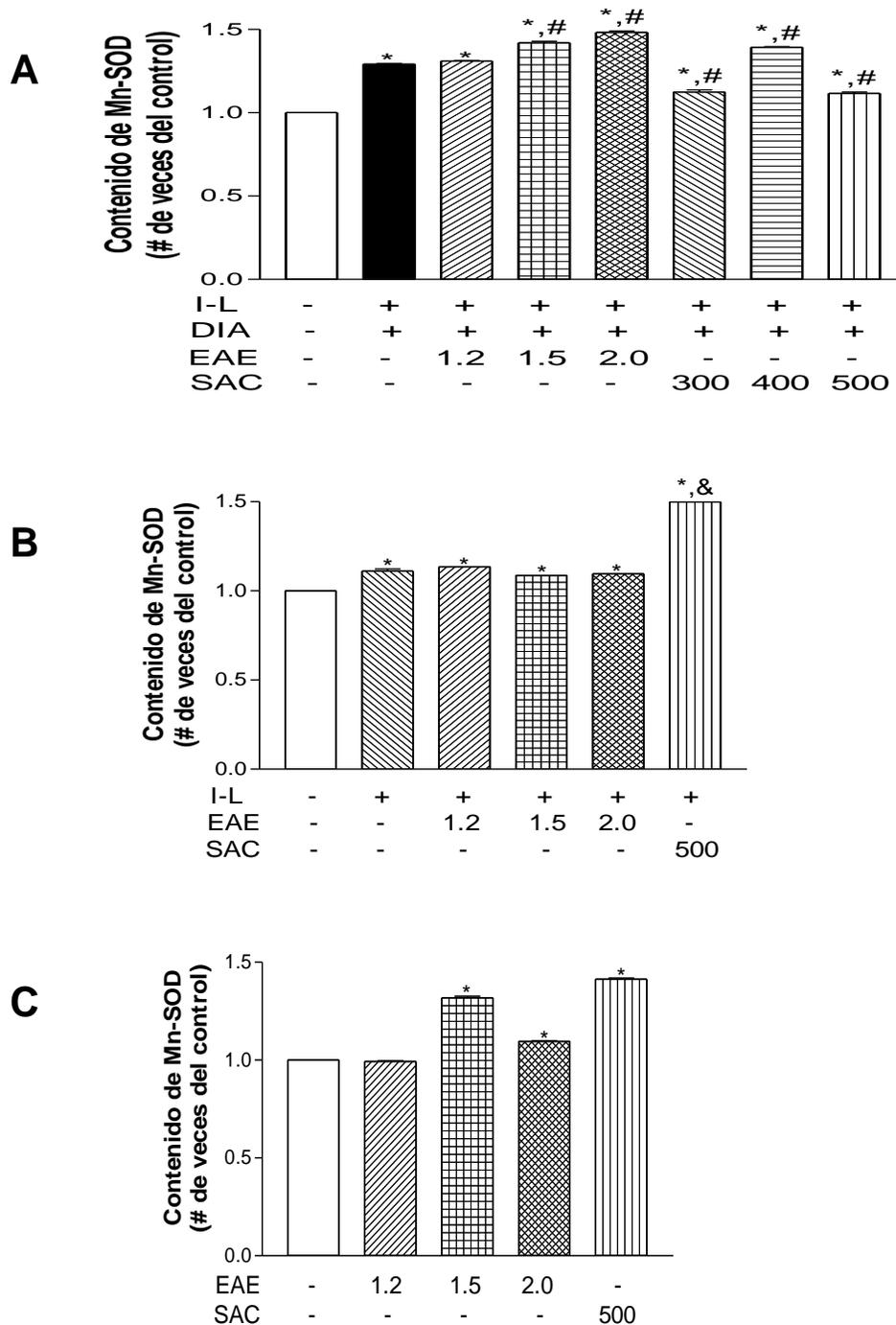


Figura 25. Contenido de superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

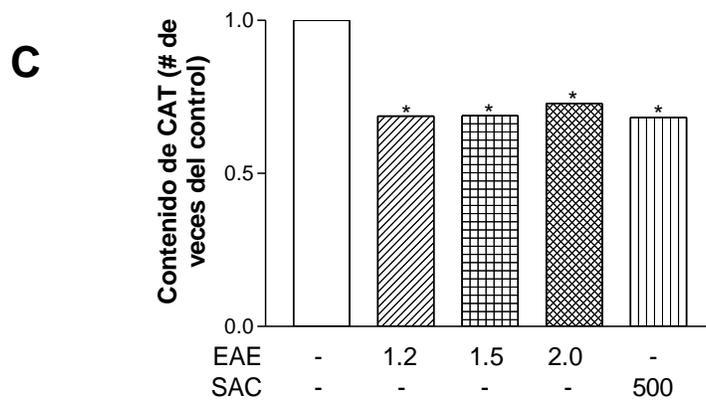
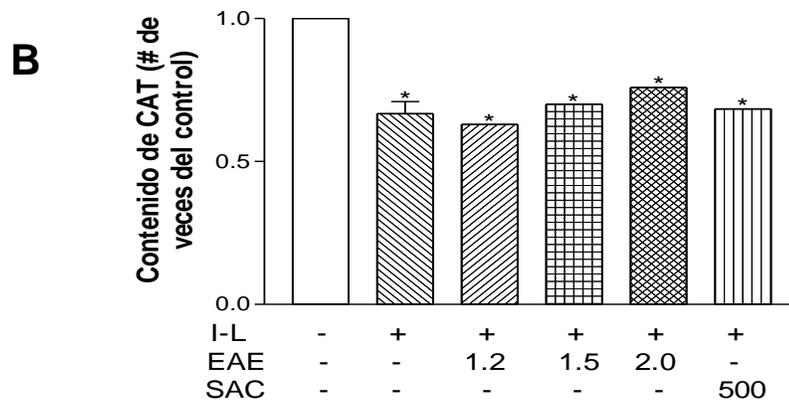
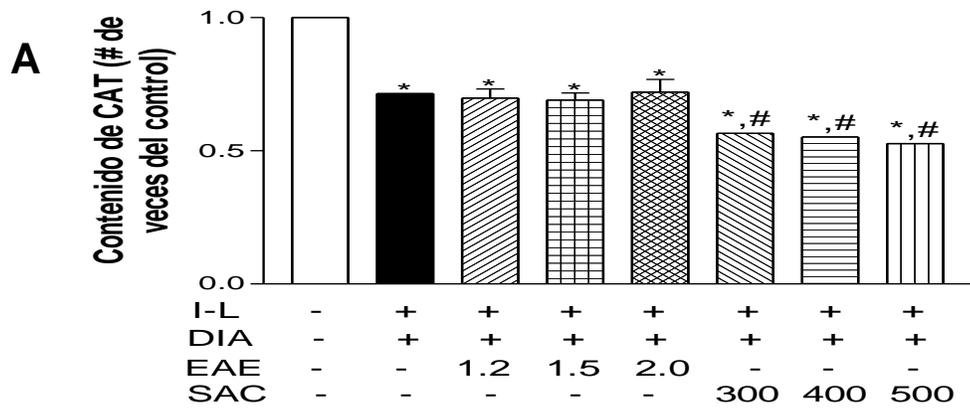


Figura 26. Contenido de catalasa (CAT) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

La expresión de CAT en las ratas sanas inyectadas con EAE (1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg) o SAC (500mg/kg) disminuyó respecto a las ratas control (Fig. 26C).

8.7. Contenido de HO-1 en homogenado renal

La expresión de HO-1 se normalizó con base en la expresión que se presentó en el grupo de las ratas con IRA-DIA, la expresión de la enzima en el grupo control no fue notable.

La expresión de HO-1 en las ratas con IRA-DIA inyectadas con 1.2 y 2.0 ml/kg de EAE fue menor que en las ratas con IRA-DIA, mientras que la dosis de 1.5 ml/kg de EAE presentó el mismo nivel de expresión de HO-1 que las ratas con IRA-DIA. Las ratas con IRA-DIA inyectadas con SAC presentaron un aumento en la expresión de HO-1, éste fue alrededor de la mitad de la expresión de la enzima en las ratas con IRA-DIA (Fig. 27A).

La expresión de HO-1 en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME fue menor que en las ratas con IRA-DIA. La administración de EAE o SAC, indometacina y L-NAME aumentó la expresión de HO-1 respecto a aquellas ratas que sólo fueron inyectadas con indometacina y L-NAME; la dosis de 1.2 ml/kg presentó un nivel de expresión de HO-1 menor que el de las ratas con IRA-DIA, mientras que la dosis de 1.5 presentó un nivel de expresión de HO-1 incluso mayor que el de las ratas con IRA-DIA. Las ratas inyectadas con 2.0 ml/kg de EAE y 500 mg/kg de SAC presentaron niveles de expresión de HO-1 similares a las ratas con IRA-DIA (Fig. 27B).

La expresión de la HO-1 en las ratas sanas inyectadas con EAE o SAC fue menor que en las ratas con IRA-DIA. Las dosis de 1.5 ml/kg de EAE y 500 mg/kg de SAC presentaron niveles de expresión de la HO-1 superiores a la mitad de la expresión de la enzima en las ratas con IRA-DIA (Fig. 27C).

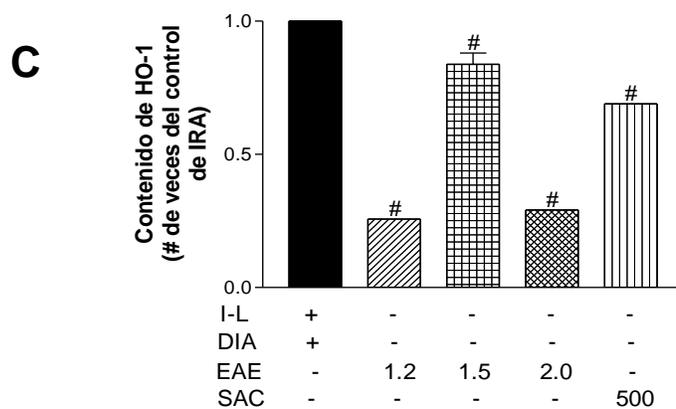
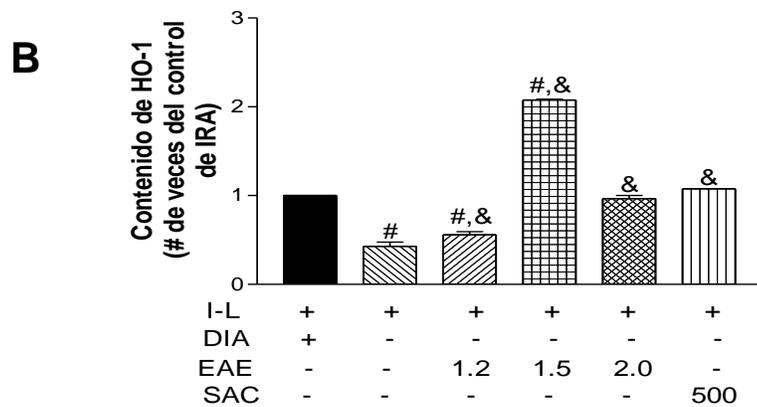
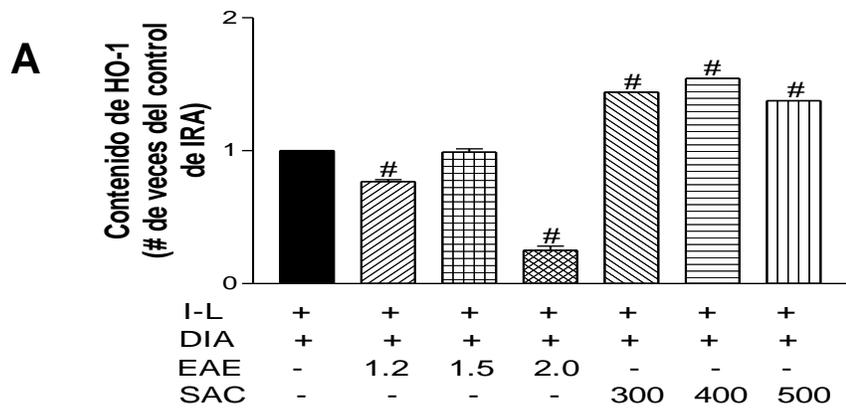


Figura 27. Contenido de hemo oxigenasa 1 (HO-1) en homogenado de riñón. Efecto del EAE y de la SAC en: **A)** ratas con IRA-DIA, **B)** ratas inyectadas con indometacina y L-NAME, **C)** ratas sanas. I-L: indometacina y L-NAME 13 mg/kg. DIA: diatrizoato 4 g iodo/kg. EAE: extracto de ajo envejecido (1.2, 1.5 y 2 ml/kg) administrado 30 min antes del modelo de IRA-DIA. SAC: S-alil-L-cisteína (300, 400 y 500 mg/kg) administrada 30 min antes del modelo de IRA-DIA. Promedio \pm EE, * $P < 0.05$ vs control (sin tratamiento); # $P < 0.05$ vs modelo de IRA-DIA (I-L-DIA); & $P < 0.05$ vs sensibilización renal (I-L).

VIII. DISCUSIÓN

El medio de contraste es un fármaco de gran utilidad en varios procedimientos de diagnóstico; sin embargo, su uso está relacionado con el desarrollo de IRA en pacientes con una o varias patologías pre-existentes. Entre éstas se encuentran enfermedades con gran incidencia en la población tales como: la diabetes, las cardiopatías, el síndrome metabólico, etc. En la actualidad, para evitar la IRA-MC sólo se realizan estrategias como: restringir fármacos nefrotóxicos, evitar la deshidratación, etc., pero no son del todo efectivos. Entre los mecanismos que se han considerado como causantes de la IRA-MC se encuentra el estrés oxidante, por lo que se ha estudiado el efecto de algunos antioxidantes; sin embargo, los resultados no son concluyentes. En este trabajo se estudió el efecto del EAE y la SAC ya que se sabe que tienen una actividad antioxidante relevante (Geng y Lau, 1997; Horie et al., 1989; Ide et al., 1997; Wei y Lau, 1998; Yamasaki y Lau, 1997).

Para realizar este trabajo, las ratas se inyectaron con indometacina y L-NAME, ya que la inyección del medio de contraste por sí sola no causó IRA, como lo indicaron Agmon y sus colaboradores (1994). Se emplearon dosis de indometacina y L-NAME a partir de 10 mg/kg ya que Pollock y sus colaboradores (1997) usaron dicha dosis para inducir IRA-DIA; sin embargo, no se obtuvieron tales resultados. Por lo tanto, se estudiaron 3 dosis más de indometacina y L-NAME. Decidimos emplear la dosis de 13 mg/kg debido a que esta dosis no elevó los niveles de SCr y no afectó el estado físico de las ratas. Aunque sí presentó una elevación en los niveles de BUN, este aumento al parecer resultó a consecuencia de la administración de indometacina y L-NAME. No se encontraron datos que respaldaran o contradijeran dicha elevación en los niveles de BUN, por lo general, los autores sólo reportan los niveles de SCr y depuración de creatinina.

A continuación, se probaron diferentes dosis de DIA. Éstas partieron de 2 g l/kg, ya que fue el volumen mínimo de DIA que indujo IRA en los experimentos de Pollock y sus colaboradores (1997). La dosis de DIA se aumentó hasta que se observó un incremento del 25% en los niveles de SCr, lo necesario, según la

literatura, para que se considerara IRA-MC; esto se consiguió con la dosis de 4 g iodo/kg. De esta manera, el modelo de IRA-DIA en ratas macho de la cepa Wistar (de 190-230 g de peso corporal) se obtuvo con la administración de 13 mg/kg de indometacina+13 mg/kg de L-NAME+4 g iodo/kg de DIA. La cantidad de medio fue diferente a la empleada por otros investigadores, pero cabe aclarar que ellos realizaron sus experimentos en ratas Sprague-Dawley. Además, utilizaron otros medios de contraste, por ejemplo: Bird y sus colaboradores (1996) utilizaron iopamidol, mientras que Yokomaku y sus colaboradores (2008) utilizaron ioversol.

Aunque puede haber diferentes esquemas de administración de los antioxidantes, decidimos administrar una sola dosis antes de hacer la administración de la indometacina, el L-NAME y el DIA; de esta manera tratamos de simular el escenario en el que el paciente recibe el antioxidante antes de que el medio de contraste le sea administrado.

Cuando se evaluó el efecto del EAE, se observó que 1.2 ml/kg de EAE fue la dosis mínima que presentó un efecto protector parcial. Ya se había descrito que dicha dosis tenía actividad renoprotectora, pero en un modelo de ratas con IRA causada por nefrectomía (Cruz et al., 2007). El EAE sólo fue evaluado hasta la dosis de 2 ml/kg ya que se observaron efectos similares respecto a la dosis de 1.2 ml/kg. En parte, resultó lógico que la administración del EAE hubiera protegido parcialmente del incremento de BUN a las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME ya que aumenta la producción de NO[•] (Moriyama et al., 2002); sin embargo, sólo la dosis de 1.5 ml/kg de EAE logró este efecto y posiblemente fue por que la dosis menor fue insuficiente y la dosis mayor fue excesiva. En cambio, los niveles de SCr no se alteraron por la administración de EAE en las ratas con función renal sensibilizada. Así mismo, se comprobó que la administración de EAE a las ratas sanas no modificó sus niveles de BUN ni de SCr.

Respecto a los resultados de la evaluación del efecto de la SAC, se observó que 300 mg/kg de SAC fue la dosis mínima que provocó una protección parcial (alrededor de 40% para BUN y 15% para SCr) contra la IRA-DIA. Además, se observó que la SAC a una dosis de 500 mg/kg revertió el aumento de los niveles

de BUN que fue ocasionado por la administración de indometacina y L-NAME. Esto era de esperarse ya que la SAC incrementa la producción de NO[•] (Kim et al., 2001). Es muy probable que la disminución en los niveles de BUN se haya debido principalmente a la SAC, ya que ésta se encuentra en una pequeña proporción en el EAE, así que la capacidad para disminuir los niveles de BUN fue menor que cuando se administró en grandes dosis (500 mg/kg). Al igual que el EAE, la SAC no presentó cambios en los valores de SCr en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME. Y se comprobó que la administración de SAC a las ratas sanas no modificó sus niveles de BUN ni de SCr.

Con lo anterior, sugerimos que las dosis de 1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg de EAE y 300, 400 y 500 mg/kg de SAC, podían usarse para proteger parcialmente la función glomerular de las ratas con IRA-DIA. Sin embargo, considerábamos que faltaban marcadores de daño renal que apoyaran nuestros hallazgos. Por lo que estudiamos otros marcadores de daño renal.

La NAG es una enzima lisosomal muy activa en las células epiteliales del túbulo proximal, es un marcador urinario específico para las células tubulares porque es de peso molecular relativamente alto (>130 kDa), lo cual impide la filtración de la enzima por el glomérulo. El aumento de la actividad de NAG en orina indica daño en las células tubulares. Sin embargo, no contábamos con muestras de orina y realizamos la determinación en homogenado renal, por lo que una disminución en la actividad significaría daño tubular. Las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME presentaron una actividad de NAG menor que aquellas con IRA-DIA. Lo que indicó que la administración de indometacina y L-NAME ocasionó mayor daño tubular que la administración del modelo de IRA-DIA. Situación que resultó controversial, ya que se esperaba que el daño fuera ocasionado o incrementado con la administración del medio de contraste como ya se había reportado (Clemenzia et al., 1991; Kavukçu et al., 2002). La única explicación lógica era que se había presentado alguna interferencia en la determinación de la actividad de NAG en las muestras de las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME. El EAE protegió parcialmente del daño tubular a las ratas con IRA-DIA, este efecto pareció

deberse a que el EAE contrarrestó la acción de la administración de indometacina y L-NAME. Por otro lado, las ratas con IRA-DIA inyectadas con SAC presentaron menor actividad de NAG que cuando sólo se administró indometacina y L-NAME. Además, la actividad de NAG fue la más baja cuando se administró SAC a las ratas sanas, lo que parecía indicar que SAC había provocado daño tubular, situación que explicaba el hecho de que la actividad de NAG hubiera disminuido en las ratas sanas que fueron administradas con SAC.

Se determinó la actividad de LDH en suero como marcador de lesión renal (Grisotto et al., 2006), aunque fuera un parámetro inespecífico. La liberación de LDH fue mayor en las ratas con IRA-DIA. Esto debido sólo a la acción del medio de contraste, ya que la liberación de LDH en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME fue menor. Sólo la dosis de 2.0 ml/kg de EAE, y las de SAC protegieron totalmente del aumento en la liberación de LDH a las ratas con IRA-DIA. Sin embargo, la dosis de 500 mg/kg de SAC aumentó la liberación de LDH en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME y en las ratas sanas. Estos resultados apoyaron la idea de un efecto dañino por parte de SAC. Aunque en este caso, a diferencia de la determinación de la actividad de NAG, la SAC resultó benéfica para las ratas con IRA-DIA y dañina para las ratas sanas. La actividad de LDH en suero no es un marcador común, por lo que no tuvimos datos para hacer comparaciones, sólo el hecho de que LDH aumenta en la IRA (Grisotto et al., 2006; Johnson et al., 2010).

De acuerdo a los resultados de actividad de NAG en homogenado renal y de liberación de LDH, se esperaba que de existir un daño provocado por SAC el estudio histológico lo confirmaría; sin embargo, no fue así. Si bien, hubo daño estructural en las ratas con IRA-DIA, este daño disminuyó cuando se administraron los antioxidantes. Por lo tanto, descartamos la teoría de que SAC era perjudicial en ausencia de daño.

La disminución en la actividad de NAG por parte de la SAC probablemente se debió a un mecanismo de inhibición de la enzima, aunque no se encontró información al respecto. En el caso del aumento en la liberación de LDH en ratas

tratadas únicamente con SAC, es muy probable que dicho aumento se haya debido a una leve hemólisis en las muestras de las ratas inyectadas con SAC.

Como marcador de estrés oxidante se evaluó el contenido de carbonilos. La determinación del contenido de carbonilos en homogenado renal indicó que hubo oxidación de proteínas en las ratas con IRA-DIA. El EAE y la SAC demostraron su actividad antioxidante ya que disminuyeron los niveles de proteínas oxidadas (ya sea parcial o totalmente) como lo describieron Maldonado y sus colaboradores (2003a, b). La dosis de 2.0 ml/kg de EAE, según este marcador, no fue tan recomendable ya que aumentó los niveles de proteínas oxidadas cuando se administró a ratas sanas. Dicho aumento se reflejó en la disminución parcial de los niveles de proteínas oxidadas en las ratas con IRA-DIA.

La actividad de la SOD en homogenado renal no disminuyó en las ratas con IRA-DIA, como en otros estudios (Cruz et al., 2007, Maldonado et al., 2003a). Resultados similares a los obtenidos, no sólo en comportamiento sino en valor, habían sido reportados por Lee y sus colaboradores (2006) en ratas inyectadas con diatrizoato. Cuando la SAC se administró la actividad de la SOD disminuyó, incluso en ratas sanas. Lo que indicó que el efecto antioxidante de la SAC, en este modelo, no se debe a un incremento en la actividad de la SOD sino a su capacidad para atrapar ERO (Ide y Lau, 1997). Posteriormente, se observó que la expresión de la CuZn-SOD y la Mn-SOD aumentó en las ratas con IRA-DIA. Las ratas con IRA-DIA inyectadas con el EAE presentaron una expresión elevada de SOD que probablemente se debió al EAE, ya que, las ratas sanas inyectadas con EAE presentaron un aumento en la expresión de la CuZn-SOD (1.2 ml EAE/kg) y la Mn-SOD (1.5 y 2.0 ml EAE/kg). La SAC también aumentó la expresión de SOD; pero la expresión de Mn-SOD disminuyó cuando se administró a las ratas con IRA-DIA, lo que indicó que la administración de SAC a las ratas con IRA-DIA tiene un efecto negativo en la expresión de Mn-SOD. Los resultados parecían contradecirse ya que un estímulo incrementaba la expresión de las enzimas y a su vez mantenía o disminuía la actividad de éstas. Sin embargo, al tener en cuenta que el EAE y la SAC también atrapan ERO, resultó fácil entender que aunque

había una mayor cantidad de las SOD, su actividad era limitada porque el EAE y la SAC estaban eliminando su sustrato.

Varios autores han indicado que la actividad de la CAT en homogenado renal disminuye al tratar a las ratas con gentamicina (Abdel-Raheem et al., 2009; Maldonado et al., 2003a), dicromato de potasio (Pedraza-Chaverrí et al 2005) y otras nefrotoxinas. La actividad de la CAT en las ratas con IRA-DIA no presentó disminución, ni diferencias en ningún grupo respecto al control, excepto en las ratas inyectadas con la SAC o con la SAC, indometacina y L-NAME. De acuerdo a estos resultados, sólo la SAC fue capaz de incrementar la actividad de la CAT en ratas sanas y en las ratas inyectadas con indometacina y L-NAME. Por otro lado, la expresión de la CAT disminuyó en las ratas con IRA-DIA y la disminución fue mayor cuando además se administró SAC. El EAE y la SAC también disminuyeron la expresión de la CAT en ratas sanas. Estos resultados contradicen los reportes que han indicado que el EAE incrementa la actividad de CAT (Wei y Lau, 1998).

La actividad de la GPx en homogenado renal fue mayor en las ratas con IRA-DIA que en las ratas control. Estos resultados no se esperaban ya que la administración de DIA, de acuerdo a los resultados de Lee y sus colaboradores (2006), provocaba una disminución de la actividad de GPx. La administración del EAE incrementó la actividad de GPx en las ratas sanas, como se había reportado antes (Wei y Lau, 1998), y en las ratas con IRA-DIA. La administración de la SAC en las ratas sanas y en las ratas con IRA-DIA no modificó la actividad de GPx, lo que indicó que SAC no tuvo efecto en la actividad de GPx.

La expresión de HO-1 no se observó en las ratas control ya que era necesario un estímulo de estrés para que ésta se expresara; en cambio, las ratas con IRA-DIA presentaron una marcada expresión de la HO-1. Por tal motivo los resultados se normalizaron respecto a este dato. Sólo el EAE (1.5 ml/kg) administrado con indometacina y L-NAME, y la SAC administrada a las ratas con IRA-DIA resultaron estímulos de estrés lo suficientemente grandes para inducir una expresión de HO-1 superior a la que presentaron las ratas con IRA-DIA. Cabe destacar que todos los grupos estudiados, excepto el control expresaron HO-1 (aunque en diferentes

niveles), lo que sugiere que todos los “elementos” que integran este modelo inducen estrés.

IX. CONCLUSIONES

- La administración de 13 mg/kg de indometacina+13 mg/kg de L-NAME+4 g iodo/kg de diatrizoato causa IRA en ratas Wistar macho de 190-230 g de peso corporal.
- El EAE (1.2, 1.5 y 2.0 ml/kg) y la SAC (300, 400 y 500 mg/kg) protegen del daño renal y oxidante a las ratas Wistar con IRA-DIA.
- El EAE y a SAC no revierten el efecto de la IRA-DIA sobre la expresión de la CuZn-SOD, la Mn-SOD ni de la CAT.
- El efecto antioxidante del EAE y la SAC en ratas Wistar con IRA-DIA se debe, principalmente, a que actúan como atrapadores de ERO.
- La IRA-DIA provoca daño renal funcional y estructural, e induce la expresión de HO-1.
- La actividad de NAG en homogenado renal y de LDH en suero no son recomendables como marcadores de daño renal, ya que no son consistentes con los resultados de los estudios histológicos.

X. REFERENCIAS

- Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA, Mohamed GA. 2009. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull* 32(1):61-67.
- Abdullah TH, Kirkpatrick DV, Carter J. 1989. Enhancement of natural killer cell activity in AIDS with garlic. *J Oncology* 21:52-53.
- Aebi HE. 1984. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 105:121-126.
- Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, Rosen S, Brezis M. 1994. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest* 94(3):1069-1075.
- Ahmad MS, Pischetsrieder M, Ahmed N. 2007. Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur J Pharmacol* 30;561(1-3):32-38.
- Al-Qattan KK, Thomson M, Al-Mutawa'a S, Al-Hajeri D, Drobiova H, Ali M. 2006. Nitric oxide mediates the blood-pressure lowering effect of garlic in the rat two-kidney, one-clip model of hypertension. *J Nutr* 136(3 Suppl):774S-776S.
- Amagase H, Milner J. 1993. Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis* 14: 1627-1631.
- Amagase H, Moriguchi T, Kasuga S. 2000. Comparison of oxidative damage of garlic preparations including entericcoated garlic powder preparation and allicin-derived compounds on erythrocyte duodenum. *Phytomed* 7(2):118.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 131(3s):955S-962S.
- Amagase H, Schaffer EM, Milner J. 1996. Dietary components modify the ability of garlic to suppress 7,12,-dimethyl(a)anthracene induced DNA adducts. *J Nutr* 126: 817-824.
- Amagase H. 1997. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. En: *Antioxidants and Disease. 6th Congress on Clinical Nutrition. Banff, Alberta, Canada. p 28 (abs).*
- Amagase H. 1998. Intake of garlic and its components. *Nutritional and Health Benefits of Garlic as a Supplement Conference. Newport Beach, CA, p 4 (abs).*
- Amagase H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr* 136(3 Suppl):716S-725S.
- Ames BN, Shingenage MK, Hagen TM. 1995. Oxidants, antioxidants diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
- Apple FS, Hyde JE, Ingersoll-Stroubos AM, Theologides A. 1991. Geographic distribution of xanthine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle. *Am J Anat* 192: 319-323.
- Asif A, Garces G, Preston RA, Roth D. 2005. Current trials of interventions to prevent radiocontrast-induced nephropathy. *Am J Ther* 12(2):127-132.
- ASRT. Sociedad Americana de Tecnólogos Radiológicos. 2001. Lo que usted necesita saber acerca de medios de contraste. www.asrt.org
- Awazu S, Horie T. 1997. Antioxidants in garlic. II. Protection of heart mitochondria by garlic extract and diallyl polysulfide from the doxorubicin-induced lipid peroxidation. En: *Nutraceuticals: Designer Foods III Garlic, Soy and Licorice. Lanchance PP (ed.). pp 131-138. Food and Nutrition Press. Trumbull, CT.*
- Babbs CF, Cregor MD, Turek JJ, Badylak SF. 1991. Endothelial superoxide production in buffer perfused rat lungs, demonstrated by a new histochemical technique. *Lab Invest* 65: 484-496.

- Bagshaw SM, Culleton BF. 2006. Contrast-induced nephropathy: epidemiology and prevention. *Minerva Cardioangiol* 54(1):109-129.
- Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, Burnett JC Jr. 1990. Radiocontrast medium induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol* 258:F115–F120.
- Barthomeuf CM, Debiton E, Barbakadze VV, Kemertelidze EP. 2001. Evaluation of the dietetic and therapeutic potential of a high molecular weight hydroxycinnamate-derived polymer from *Symphytum asperum* Lepech. Regarding its antioxidant, antilipoperoxidant, antiinflammatory, and cytotoxic properties. *J Agric Food Chem* 49: 3942-3946.
- Baud L, Ardaillou R. 1986. Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am J Physiol* 251: F765-F776.
- Beauchamp C, Fridovich I. 1970. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245: 4641-4646.
- Becker CR, Davidson C, Lameire N, McCullough PA, Stacul F, Tumlin J, Adam A. 2006. CIN Consensus Working Panel. High-risk situations and procedures. *Am J Cardiol* 98:37K–41K.
- Belman S, Solomon J, Segal A. 1989. Inhibition of soybean lipoxygenase and mouse skin tumor promotion by onion and garlic compounds. *J Biochem Toxicol* 4:151–160.
- Bird JE, Giancarli MR, Megill JR, Durham SK. 1996. Effects of endothelin in radiocontrast-induced nephropathy in rats are mediated through endothelin-A receptors. *J Am Soc Nephrol* 7:1153–1157.
- Block E, Ahmad S, Jain MK, Crecely RW, Apitz-Castro R, Cruz MR. 1984. (*E,Z*)-Ajoene: a potent antithrombic agent from garlic. *J Am Chem Soc* 106: 8295–8296.
- Block E. 1985. The chemistry of garlic and onion. *Sci Am* 252:114–119.
- Borek C. 1993. Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. *Environ Health Perspect* 101: 237–245.
- Borek C. 1997. Antioxidants and cancer. *Sci Med* 4:51–62.
- Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 131(3s):1010S-1015S.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630.
- Botella J. 2002. *Manual de nefrología clínica*. Ed. Masson. Barcelona, España.
- Brenner BM. 2005. *El riñón*. Elsevier. 7ª edición. España.
- Brigelius-Flohé R, Traber MG. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 13:1145-1155.
- Brigelius-Flohé R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27:951-965.
- Briguori C, Airoidi F, D'Andrea D, Bonizzoni E, Morici N, Focaccio A, Michev I, Montorfano M, Carlino M, Cosgrave J, Ricciardelli B, Colombo A. 2007. Renal insufficiency following contrast media administration trial (REMEDIAL): a randomized comparison of 3 preventive strategies. *Circulation* 115:1211–1217.
- Briguori C, Airoidi F, Morici N, Colombo A. 2005. New pharmacological protocols to prevent or reduce contrast media nephropathy. *Minerva Cardioangiol* 53(1):49-58.
- Budoff M, Takasu J, Flores FR, Niihara Y, Lu B, Lau B, Rosen RT, Amagase H. 2004. Inhibiting progression of coronary calcification using aged garlic extract in patients receiving statin therapy: a preliminary study. *Prev Med* 39:985–991.
- Burden AD, Wilkinson SM, Beck MH, Chalmers RJG. 1994. Garlic-induced systemic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 30: 299–300.

- Cadenas E, Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 29: 222-230.
- Caporaso N, Smith SM, Eng RHK. 1983. Antifungal activity in human urine and serum after ingestion of garlic (*Allium sativum*). *Antimicrob Agents Chemother* 23: 700–702.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- Charpie JR, Webb RC. 1993. Vascular myocyte-derived nitric oxide is an autocrine that limits vasoconstriction. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 763-768.
- Chaudhury S, Sarker PK. 1983. Stimulation of tubulin synthesis by thyroid hormone in the developing rat brain. *Biochem Biophys Acta* 763: 93-98.
- Chung HT, Burnham B, Robertson LK, Daynes RA. 1986. Involvement of prostaglandins in the immune alterations caused by the exposure of mice to ultraviolet radiation. *J Immunol* 137:2478–2484.
- Clemenzia G, Marvelli M, Sagliaschi G, Persichetti S, Re M, Gallo G, Spinelli C, Angelitti A, Punzo G, Maggi S, et al. 1991. The evaluation of urinary NAG activity in patients undergoing urography. *Minerva Med* 82(4):195-200.
- Commoner B, Townsend J, Pake GE. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689-691.
- Crane FL, Sun IL, Clark MG, Grebing C, Low H. 1985. Transplasma-membrane redox systems in growth and development. *Biochim Biophys Acta* 811: 233-264.
- Cruz C, Correa-Rotter R, Sánchez-González DJ, Hernández-Pando R, Maldonado PD, Martínez-Martínez CM, Medina-Campos ON, Tapia E, Aguilar D, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. 2007. Renoprotective and antihypertensive effects of S-allylcysteine in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(5):F1691-F1698.
- Davidson C, Stacul F, McCullough PA, Tumlin J, Adam A, Lameire N, Becker CR. 2006. CIN Consensus Working Panel. Contrast medium use. *Am J Cardiol* 18;98(6A):42K-58K.
- Deby C, Goutier R. 1990. New perspective on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. *Biochem Pharmacol* 39: 399-405.
- Desai HG, Kalro RH, Choksi AP. 1990. Effect of ginger and garlic on DNA content of gastric aspirate. *Indian J Med Res* 92: 139–141.
- Devrim E, Cetin M, Namuslu M, Ergüder IB, Cetin R, Durak I. 2009. Oxidant stress due to non ionic low osmolar contrast medium in rat kidney. *Indian J Med Res* 130(4):433-436.
- Díaz A, Rangel P, Montes de Oca Y, Lledías F, Hansberg W. 2001. Molecular and kinetic study of catalase–1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Rad Biol Med* 31:1323-1333.
- Dimitrov NV, Bennink MR. 1997. Modulation of arachidonic acid metabolism by garlic extract. En: *Nutraceuticals: Designer Foods III Garlic, Soy and Licorice*. Lanchance PP (ed.). pp 199–120. Food & Nutrition Press. Trumbull, CT.
- Dinger B, He L, Chen J, Liu X, Gonzalez C, Obeso A, Sanders K, Hoidal J, Stensaas L, Fidone S. 2007. The role of NADPH oxidase in carotid body arterial chemoreceptors. *Respir Physiol Neurobiol* 157: 45-54.
- Dion ME, Agler M, Milner JA. 1997. S-allyl cysteine inhibits nitrosomorpholine formation and bioactivation. *Nutr Cancer* 28:1–6.
- Dixit VP, Joshi S. 1982. Effects of chronic administration of garlic (*Allium sativum* linn) on testicular function. *Indian J Exp Biol* 20: 534–536.
- Dizdaroglu M. 1990 Gas chromatography-mass spectrometry of free radical-induced products of pyrimidines and purines in DNA. *Methods Enzymol* 193: 841-857.

- Dong Z, Lavrovsky Y, Venkatachalam MA, Roy AK. 2000. Heme oxygenase-1 in tissue pathology: the Yin and Yang. *Am J Pathol* 156(5):1485-1488.
- Duncan CJ, Rudge MF. 1988. Are lysosomal enzymes involved in rapid damage in vertebrate muscles? A study of the separate pathways leading to cellular damage. *Cell Tissue Res* 253: 447-455.
- Efendy JL, Simmons DL, Campbell GR, Campbell JH. 1997. The effect of aged garlic "kyolic" on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 132:37-42.
- Elstner EF. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 73-82.
- Erley C. 2007. Iodinated contrast agent-induced nephropathy. *Radiologe* 47(9):761-767.
- Fang RZ. 1989. Radical and Enzyme, Science Press, Beijing, p. 153.
- Fenwick GR, Hanley AB. 1985. The genus *Allium*. Part 2. *Crit Rev Food Sci Nutr* 22: 273-377.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Fishbane S. 2008. N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 3(1):281-287.
- Fraile E, García L. 2008. Medios de contraste yodados iónicos: moléculas y propiedades. En Monografía SERAM Medios de contraste en radiología. Martí-Bonmatí L, Pallardó Y. Ed. Médica Panamericana. Madrid, pp 3.
- Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
- Freeman BD. 1984. Biological sites and mechanisms of free radical production. En: Free radicals molecular biology, aging, and disease. Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slater TE. (eds). Raven, New York, pp 43-52.
- Fridovich I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44: 147-159.
- Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases. *Science* 201: 875-880.
- Fridovich I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264: 7761-7764.
- Ganong WF. 2006. Fisiología Médica. El Manual Moderno. 20ª edición. México.
- Garty BZ. 1993. Garlic burns. *Pediatrics* 91: 658-659.
- Geng Z, Lau BHS. 1997. Aged garlic extracts modulate glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 11:54-56.
- Geng Z, Rong Y, Lau BHS. 1997. S-Allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* 23:345-350.
- Giannattasio M. 2005. [Contrast-induced acute renal failure]. *G Ital Nefrol* 22(3):217-225.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. 2001. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40: 957-961.
- Goldenberg I, Matetzky S. 2005. Nephropathy induced by contrast media: pathogenesis, risk factors and preventive strategies. *CMAJ* 24;172(11):1461-1471.
- Gómez LE, Cuevas DB. 2008. Superóxido diamutasa. En: Radicales libres y estrés oxidativo, Aplicaciones médicas. Konigsberg M. Manual Moderno. México, DF.
- González C, Agapito MT, Rocher A, Gonzalez-Martin MC, Vega-Agapito V, Gomez-Niño A, Rigual R, Castañeda J, Obeso A. 2007. Chemoreception in the context of the general biology of ROS *Respir Physiol Neurobiol* 157: 30-44.
- Grisotto LS, Mendes GE, Castro I, Baptista MA, Alves VA, Yu L, Burdmann EA. 2006. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. *Toxicon* 48(1):44-54.
- Gutteridge JMC. 1993. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 19:141-158.

- Guyton AC, Hall EJ. 2006. *Tratado de Fisiología Médica*. Elsevier. 11ª edición. España.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 251: 9-19.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1992. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism, and measurement using chromatographic methods. En *Molecular biology of free radical scavenging systems*; Scandalios JG, Ed. CSHL: New York, pp 23-27, 47-58.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8: 89-193.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246: 501–514.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update *FEBS Lett* 307: 108-112.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Press, New York.
- Halliwell B. 1978a. Sonographic demonstration of intrauterine contraceptive devices. *Cell Biol Int Rep* 2: 113-128.
- Halliwell B. 1978b. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett* 92: 321-326.
- Halliwell B. 1978c. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system. *FEBS Lett* 96: 238-242.
- Halliwell, B. 1981. En *Age Pigments* (Sohal RS, ed.), pp. 1-62, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Halliwell, B. 1991. The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species. In *Free radicals and food additives*; Aruoma OI, Halliwell B, Eds.; Taylor & Francis Inc: PA, pp 41-45.
- Hansberg W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. En *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. Cea Bonilla A, del Arrenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez-Contreras E (eds.). Depto. Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM. Ciudad Universitaria. DF, México.
- Hasegawa Y, Kikuchi N, Kawashima Y, Shimizu K, Nishiyama M. 1983. Clinical effects of Kyoleopin against various indefinite complaints in the field of internal medicine. *Shinyaku To Rinsho* 32:365–376.
- Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agric Food Chem* 46: 4107-4112.
- Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. 2008. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 3(1):288-296.
- Horie T, Awazu S, Itakura Y, Fuwa T. 1992. Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med* 58: 468–469.
- Horie T, Awazu S, Itakura Y, Fuwa T. 2001. Alleviation of garlic of antitumor drug-induced damage to the intestine. *J Nutr* 131:1071S–1074S.
- Horie T, Matsumoto H, Kasagi M, Sugiyama A, Kikuchi M, Karasawa C, Awazu S, Itakura Y, Fuwa T. 1999. Protective effect of aged garlic extract on the small intestinal damage of rats induced by methotrexate administration. *Planta Med* 65:545–548.

- Horie T, Murayama T, Mishima T, Fumiyaki I, Minamide Y, Fuwa T, Awaxu S. 1989. Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med* 55: 506–508.
- Hu JJ, Yoo JS, Lin M, Wang EJ, Yang CS. 1996. Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. *Food Chem Toxicol* 34:963–969.
- Ide N, Lau BHS. 1997. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J Pharm Pharmacol* 49:908–911.
- Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effects of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 10:340-341.
- Ide N, Nelson AB, Lau BHS. 1997. Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* 63:263–264.
- Imada O. 1990. Toxicity aspects of garlic. En: *First World Congress on the Health Significance of Garlic and Garlic Constituents*. Nutrition International. Irvine, CA. p 47.
- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. 1994. Antioxidants and free radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 60:417–420.
- Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R. 2005. Clinical and experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast media. *J Pharmacol Sci* 97:473-488.
- Joannidis M. 2007. Medical therapy of acute kidney injury. *Acta Clin Belg Suppl* 2:353-356.
- Johnson AC, Becker K, Zager RA. 2010. Parenteral iron formulations differentially affect MCP-1, HO-1, and NGAL gene expression and renal responses to injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F426-F435.
- Jung K, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. 1991. Methods compared for determining activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme* 45:215-221.
- Kaku H, Goldstein IJ, Van Damme EJM, Peumans W. 1992. New mannose-specific lectins from garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*) bulbs. *Carbohydr Res* 229: 347–353.
- Kandil OM, Abdullah TH, Tabuni AM, Elkadi A. 1988. Potential role of *Allium sativum* in natural cytotoxicity. *Arch AIDS Res* 1:230–231.
- Kanezawa A, Nakagawa S, Sumiyoshi H, Masamoto K, Harada H, Nakagami S, Date S, Yokota A, Nishikawa M, Fuwa T. 1984. General toxicity tests of garlic extract preparation (Kyoleopin) containing vitamins. *Oyo Yakuri* 27:909–929.
- Katsunuma S. 1932. On effect of garlic on anemia. *Exp Med* 18: 442–444.
- Kavukçu S, Soylu A, Türkmen M. 2002. The clinical value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase levels in childhood age group. *Acta Med Okayama* 56(1):7-11.
- Kawashima Y, Ochiai Y, Fujisaki I. 1989. Clinical study of Kyoleopin for patients with hyperlipidemia. *Shinryou To Shinyaku* 26:377–388.
- 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.
- Kitchin KT, Anderson WL, Suematsu M. 2001. An ELISA assay for heme oxygenase (HO-1). *J Immunol Methods* 1; 247:153-161.
- Klotz MG, Klassen GR, Loewen PC. 1997. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol Evol* 14:951-958.
- Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, Hai S, Yamamoto S, Kubo S, Yoshida Y, Niki E, Okada S, Hirohashi K, Suehiro S. 2007. S-allyl cysteine prevents CCl₄-induced acute liver injury in rats. *Free Radic Res* 41(4):489-497.

- Kojima R, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chan PH. 1994. Protective effects of aged garlic extracts on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. *Nutr Cancer* 22:163–173.
- Kozumbo WJ, Trush MA, Kensler TW. 1985. Are free radicals involved in tumor promotion? *Chem Biol Interact* 54: 199-207.
- Kuzutani S. 1934. On effects of garlic (*Allium scorodoprasum* L.) on anemia. *Clin Pathol Hematol* 3: 1175–1233.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lameire N, Adam A, Becker CR, Davidson C, McCullough PA, Stacul F, Tumlin J. 2006. CIN Consensus Working Panel. Baseline renal function screening. *Am J Cardiol* 98:21K–26K.
- Lau BHS. 1989. Detoxifying, radioprotective and phagocyte-enhancing effects of garlic. *Int Nutr Rev* 9:27–31.
- Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. 1990. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J Appl Physiol* 68: 2337-2344.
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.
- Lee HC, Yen HW, Sheu SH. 2006. Effects of different contrast media on glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in the heart and kidneys of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Formos Med Assoc* 105(7):530-535.
- Lee Y, Yeh Y. 2003. Inhibitory effects of garlic extract and water-soluble organosulfur compounds of garlic on cholesterol synthesis in HepG-2 cells. *FASEB J.* 17(4): A752, #455.1.
- Lembo G, Balato N, Patruno C, Auricchio L, Ayala F. 1991. Allergic contact dermatitis due to garlic (*Allium sativum*). *Contact Dermatitis* 25:330–331.
- Liu JZ, Lin XY, Milner JA. 1992. Dietary garlic powder increases glutathione content and glutathione S-transferase activity in rat liver and mammary tissues. *FASEB J* 6:A3230 (abs).
- Liu R, Nair D, Ix J, Moore DH, Bent S. 2005. N-acetylcysteine for the prevention of contrast-induced nephropathy. A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med* 20(2):193-200.
- Lledías F, Rangel P, Hansberg W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* 273:10630-10637.
- Lybarger JA, Gallagher JS, Pulver DW, Litwin A, Brooks S, Bernstein IL. 1982. Occupational asthma induced by inhalation and ingestion of garlic. *J Allergy Clin Immunol* 69: 448–454.
- Macan H, Uykimpang R, Alconcel M, Takasu J, Razon R, Amagase H, Niihara Y. 2006. Aged garlic extract may be safe for patients on warfarin therapy. *J Nutr* in press.
- Mader FH. 1990. Treatment of hyperlipidaemia with garlic-powder tablets. *Arzneim-Forsch* 40: 3–8.
- Mahin MD. 1992. Heme oxygenase: clinical applications and functions. Florida:CRC Press Inc.
- Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverrí J. 2003b. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 73(20):2543-2556.
- Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. 2003a. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 35(3):317-324.

- Malyszko J. 2010. Biomarkers of acute kidney injury in different clinical settings: a time to change the paradigm? *Kidney Blood Press Res* 33(5):368-382.
- Marin J, Rodriguez-Martinez MA. 1995. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol* 15: 279-307.
- Matsuura H, Ushiroguchi T, Itakura Y, Hayashi H, Fuwa T. 1988. A furostanol glycoside from garlic bulbs of *Allium sativum* L. *Chem Pharm Bull* 36: 3659–3663.
- Maxwell SRJ. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49: 345-361.
- McCord JM, Day ED. 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett* 86: 139-142.
- McCullough PA, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, Stacul F, Tumlin J. 2006b. CIN Consensus Working Panel. Risk prediction of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol* 98:27K–36K.
- McCullough PA, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, Stacul F, Tumlin J. 2006a. CIN Consensus Working Panel. Epidemiology and prognostic implications of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol* 98:5K–13K.
- McCullough PA. 2008. Contrast-induced acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol* 15;51(15):1419-1428. Review.
- McCutchan HJ, Schwappach JR, Enquist EG, Walden DL, Terada LS, Reiss OK, Leff JA, Repine JE. 1990. Xanthine oxidase-derived H₂O₂ contributes to reperfusion injury of ischemia skeletal muscle. *Am J Physiol* 258: H1415-H1419.
- McFadden JP, White IR, Rycroft RJ. 1992. Allergic contact dermatitis from garlic. *Contact Dermatitis* 27: 333–334.
- MD-76R. www.drugs.com/pro/md-76r.html
- Milner JA. 1996. Garlic: its anticarcinogenic and antimutagenic properties. *Nutr Rev* 54: S82–S86.
- Mitchell D, Tymi K. 1996. Nitric oxide release in rat skeletal muscle capillary. *Am J Physiol* 270: H1696-H1703.
- Mitchell JC. 1980. Contact sensitivity to garlic (*Allium*). *Contact Dermatitis*. 6:356–357.
- Miyamoto T. 1938. Effects of garlic water-soluble but alcohol-insoluble component and garlic volatile oil on blood serum protein and residual nitrogen. *J Manchurian Med* 28: 285–296.
- Mohazzab-H KM, Wolin MS. 1994. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 267: L815-L822.
- Moriguchi T, Itakura Y, et al. 1998. Recent Advances on the Nutritional Benefits Accompanying the Use of Garlic as a Supplement. Newport Beach, CA. November 15-17.
- Moriguchi T, Saito H, Nishiyama N. 1997. Anti-aging effect of aged garlic extract in the inbred brain atrophy mouse model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24:235–242.
- Moriguchi T, Takasugi N, Itakura Y. 2001. The effects of aged garlic extract on lipid peroxidation and the deformability of erythrocytes. *J Nutr* 131:1016S-1019S.
- Morihara N, Hayama M, Fujii H. 2011. Aged Garlic Extract Scavenges Superoxide Radicals. *Plant Foods Hum Nutr*.
- Morihara N, Sumioka I, Moriguchi T, Uda N, Kyo E. 2002. Aged garlic extract enhances production of nitric oxide. *Life Sci* 71:509-517.
- Mujahid A, Akiba Y, Warden CH, Toyomizu M. 2007. Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens *FEBS Lett* 581: 3461-3467.
- Mullineaux PM, Creissen GP. 1997. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA

- Murrant CL, Reid MB. 2001. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 55: 236-248.
- 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.
- Nakagawa S, Masamoto K, Sumiyoshi H, Harada H. 1984a. Acute toxicity of garlic extract. *J Toxicol Sci* 9: 57-60.
- Nakagawa S, Masamoto K, Sumiyoshi H, Kunihiro K, Fuwa T. 1980. Effect of raw garlic juice and aged garlic extract on growth of young rats and their organs after peroral administration. *J Toxicol Sci* 5: 91-112.
- Nakagawa S, Sumiyoshi H, Masamoto K, Kanezawa A, Harada H, Nakagami S, Date S, Yokota A, Nishikawa M, Fuwa T. 1984b. Acute and subacute toxicity tests of a ginseng and garlic preparation containing vitamin B1 (Leopin-five). *Oyo Yakuri* 27:1133-1150.
- Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. 1996. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int* 50: 1032-1043.
- Nath KA, Norby SM. 2000. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 109: 665-678.
- Naughton P, Foresti R, Bains SK, Hoque M, Green CJ, Motterlini R. 2002. Induction of heme oxygenase 1 by nitrosative stress. A role for nitroxyl anion. *J Biol Chem* 277(43):40666-40674.
- Neil H, Sigali C. 1994. Garlic, its cardioprotective properties. *Curr Top Lipidol* 5:6-10.
- Nishino H, Nishino A, Takayasu A, Iwashima Y, Itakura Y, Koderia Y, Matsuura H, Fuwa T. 1990. Antitumor promoting activity of allixin, a stress compound produced by garlic. *Cancer J* 3:20-21.
- Nishiyama N, Moriguchi T, Katsuki H, Saito H. 1996. Effects of aged garlic extract on senescence accelerated mouse and cultured brain cells. En: *Preclinical and Clinical Strategies for the Treatment of Neurodegenerative, Cerebrovascular and Mental Disorders*, Vol. 11. pp 253-258. Krager, Basel, Switzerland.
- Numagami Y, Sato S, Onishi T. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as an antioxidants. *Neurochem Int* 29: 135-143.
- Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105:457-464.
- O'Brien J, Gillies DG. 1998. Product of the Maillard reaction in aged garlic extract are antioxidants. *Nutritional and Health Benefits of Garlic as a Supplement Conference*. Newport Beach, CA. p 66 (abs).
- Okabe E, Kato Y, Kohno H, Hess ML, Ito H. 1985. Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of the effect of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol* 34: 961-968.
- Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. Hemooxygenasa. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. En *Konigsberg M, editor, México: Manual Moderno, 2008.*
- Oudemans-van Straaten HM. 2005. Strategies to prevent contrast nephropathy. *Minerva Cardioangiol* 53(5):445-463.
- Pannu N, Manns B, Lee H, Tonelli M. 2004. Systematic review of the impact of N-acetylcysteine on contrast nephropathy. *Kidney Int* 65:1366-1374.
- Panus PC, Radi R, Chumley PH, Lillard RH, Freeman BA. 1993. Detection of H₂O₂ release from vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 14: 217-223.
- Parish RA, McIntire S, Heimbach DM. 1987. Garlic burns: a naturopathic remedy gone awry. *Pediatr Emerg Care* 3: 258-260.
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Medina-Campos ON, Carvajal RC, Hernández-Pando R, Macías-Ruvalcaba NA, Maldonado PD, Salcedo MI, Tapia E, Saldívar L, Castilla

- ME, Ibarra-Rubio ME. 2005. Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol* 6:4.
- Persson PB, Hansell P, Liss P. 2005. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int* 68: 14–22.
- Pietta P, Simonetti P. 1998. Recent Advances on the Nutritional Benefits Accompanying the Use of Garlic as a Supplement. Newport Beach, CA. November 15-17.
- Platt JL, Nath KA. 1998. Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse. *Nat Med* 4(12):1364-1365.
- Pocock G, Richards CD. 2005. *Fisiología Humana la Base de la Medicina*. Masson. 2ª edición. México.
- Pollock DM, Polakowski JS, Wegner CD, Opgenorth TJ. 1997. Beneficial effect of ETA receptor blockade in a rat model of radiocontrast-induced nephropathy. *Ren Fail* 19(6):753-761.
- Pucelikova T, Dangas G, Mehran R. 2008. Contrast-induced nephropathy. *Catheter Cardiovasc Interv* 71(1):62-72.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296: 295-309
- Qian YX, Shen PJ, Xu RY, Liu GM, Yang HQ, Lu YS, Sun P, Zhang RW, Qi LM, Lu QH. 1986. Spermicidal effect in vitro by the active principle of garlic. *Contraception* 34: 295–302.
- Qureshi N, Lin R, et al. 1990. First World Congress on the Health Significance of Garlic and Garlic Constituents. Washington, D.C. August 28-30. p 17.
- Rahman K, Lowe GM. 2006. Garlic and Cardiovascular Disease: A Critical Review. *J Nutr* 136 Suppl 3:S736-S740.
- Reeve VE, Bosnic M, Rosinova E, Boehm-Wilcox C. 1993. A garlic extract protects from ultraviolet B (280–320 nm) radiation induced suppression of contact hypersensitivity. *Photochem Photobiol* 58:813–817.
- Remacle J, Renard P. 1996. Role of oxidative stress in aging. *Path Biol* 44: 65-76.
- Reznick A, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-363.
- Riberia J, Marsal J, Casasovas A, Hukkanen M, Tarabal O, Esquerda JE. 1998. Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51: 90-102.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-795.
- Rivlin R. 2001. Historical perspective on the use of garlic. *J Nutr* 131: 951S–954S.
- Roberfroid M, Calderon PB. 1995. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker, Inc. USA.
- Rojas P, Serrano-García N, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Ruiz-Sánchez E. 2010. S-Allylcysteine, a garlic compound, protects against oxidative stress in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism in mice. *J Nutr Biochem*.
- Rosen GM, Freeman BA. 1984. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 81: 7269-7273.
- Rosenfield V, Scisca TS, Callahan AK, Crain JL. 2000. Double-blind, randomized, placebo-controlled trial of aged garlic extract in patients stabilized on warfarin therapy. *Am Soc Health-System Pharmacists (ASHP)* (poster presentation). Las Vegas, NV.

- Ross EA, Koo LC, Moberly JB. 1997. Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 30: 489-494.
- Sanaei-Ardekani M, Movahed MR, Movafagh S, Ghahramani N. 2005. Contrast-induced nephropathy: a review. *Cardiovasc Revasc Med* 6(2):82-88.
- Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders *J Neurol Sci* 257: 221-239.
- Satue-Gracia MT, Heinonen IM, Frankel EN. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J Agric Food Chem* 45: 3362-3367.
- Schröder R. 2005. Contrast material-induced renal failure: an overview. *J Interv Cardiol* 18(6):417-423.
- Shah SV, Walker PD. 1992. Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure. *Ren Fail* 14: 363-370.
- Shashikanth KN, Basappa SC, Murthy VS. 1986. Effect of feeding raw and boiled garlic (*Allium sativum* L.) extracts on the growth, caecal microflora, and serum proteins of albino rats. *Nutr Rep Int* 33: 313–319.
- Siegers CP. 1992. *Allium sativum*. En: *Adverse Effects of Herbal Drugs*. Smet PAGM, Keller K, Hansel R, Chandler RF (eds.). pp. 73–77. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- Sies H, Ketterer B. 1988. Glutathion conjugation. Academic Press. Inglaterra.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219.
- Spargias K, Alexopoulos E, Kyrzopoulos S, Iokovis P, Greenwood DC, Manginas A, Voudris V, Pavlides G, Buller CE, Kremastinos D, Cokkinos DV. 2004. Ascorbic acid prevents contrast-mediated nephropathy in patients with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention. *Circulation* 110:2837– 2842.
- Stacul F, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, McCullough PA, Tumlin J. 2006. CIN Consensus Working Panel. Strategies to reduce the risk of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol* 98:59K–77K.
- Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TL, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Paintadosi CA. 1997. Blood flow regulation by S-nitrosohaemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037.
- Steenken S. 1989. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chem Res* 89: 503-520.
- Steinberg, D. 1991. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation* 84: 1420-1425.
- Steiner M, Kham AH, Holbert D, Lin RIS. 1996. A double-blind crossover study in moderately hypercholesteremic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am J Clin Nutr* 64: 866–870.
- Steiner M, Lin R. 1994. Cardiovascular and lipid changes in response to aged garlic extract ingestion. *J Am Coll Nutr* 13:524.
- Steiner M. 1996. A double blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compares the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids and platelet function. *J Clin Nutr* 64:866–870.
- Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. 1994. Vegetables, fruit and colon cancer in the Iowa Woman's Study. *J Epidemiol* 139:1–5.
- Sugii M, Suzuki T, Nagasawa S, Kawashima K. 1964. Isolation of g-glutamyl-S-allylmercapto-L-cysteine and S-allylmercapto-L-cysteine from garlic. *Chem Pharm Bull* 12: 1114–1115.

- Sumiyoshi H, Kanezawa A, Masamoto K, Harada H, Nakagami S, Yokota A, Nishikawa M, Nakagawa S. 1984. Chronic toxicity test of garlic extract in rats. *J Toxicol Sci* 9: 61–75.
- Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K, Yamaya K. 1996. Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 81: 1213-1222.
- Tang Bo, Zhang Li, Hua Ji-Xi, Li Ping, Zhang Hui, Zhao Yan-Xiu. 2004. Indirect determination of superoxide anion radical in the plant of red sage based on vanillin-8-aminoquinoline with fluorescence. *Anal Chim Acta* 502: 125-131.
- Tepel M, van der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. 2000. Prevention of radiographic contrast agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *N Engl J Med* 343:180–184.
- Tepel M. 2003. Acetylcysteine for the prevention of radiocontrast -induced nephropathy. *Minerva Cardioangiol* 51(5):525-530.
- Toledo I, Noronha-Dutra AA, Hansberg W. 1991. Loss of NAD(P)–reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 173:3243-3249.
- Toprak O, Cirit M, Tanrisev M, Yazici C, Canoz O, Sipahioglu M, Uzum A, Ersoy R, Sozmen EY. 2008. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. *Nephrol Dial Transplant* 23(3):853-859.
- Toprak O. 2007. Risk markers for contrast-induced nephropathy. *Am J Med Sci* 334(4):283-290.
- Tortora GJ, Reynolds GS. 2006. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Oxford University Press. 9ª edición. México.
- Touati C, Idee JM, Deray G, Santus R, Balut C, Beaufiles H, Jouanneau C, Bourbouze R, Doucet D, Bonnemain B. 1993. Modulation of the renal effects of contrast media by endothelium-derived nitric oxide in the rat. *Invest Radiol* 28(9):814-820.
- Tumlin J, Stacul F, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, McCullough PA. 2006. CIN Consensus Working Panel. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol* 98:14K–20K.
- Ueda N, Walker P, Shah SV. 1995. Oxidant stress in acute renal failure. En: *Acute Renal Failure: New Concepts and Therapeutic Strategies*. Edited by Goligorsky MS, Stein JH. New York: Churchill Livingstone.
- Venkataraman R. 2008. Can we prevent acute kidney injury? *Crit Care Med* 36(4 Suppl):166-171.
- Von Kirsten D, Meister W. 1985. Berufsbedingte knoblauchallergie. *Allergologie Jahrgang* 8: 511–512.
- Von Sonntag C. 1987. *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London.
- Walker PD, Shah SV. 1987. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 253: C495-C499.
- Wang BH, Zuel KA, Rahaman K, Billington D. 1998. Protective effects of aged garlic extract against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices. *Toxicology* 126: 213–222.
- Wang SY, Jiao H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J Agric Food Chem* 48: 5677-5684.
- Wei Z, Lau BHS. 1998. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 18:61–70.
- Weinberg JM. 1991. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 39: 476-500.

- Weisbord SD, Palevsky PM. 2005. Radiocontrast-induced acute renal failure. *J Intensive Care Med* 20: 63–75.
- World Health Organization. 1999. WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 1. Geneva: WHO, 289 pp.
- Yamasaki T, Lau BHS. 1997. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidant injury. *Folia Pharmacol Jpn* 110: Suppl 1:138–141.
- Yamasaki T, Li L, Lau B. 1994. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Phytother Res* 8:408–412.
- Yamasaki T, Teel RW, Lau BHS. 1991. Effect of allixin, a phytoalexin produced by garlic, on mutagenesis, DNA-binding and metabolism of aflatoxin B1. *Cancer Lett* 59: 89–94.
- Yang DW, Jia RH, Yang DP, Ding GH, Huang CX. 2004. Dietary hypercholesterolemia aggravates contrast media-induced nephropathy. *Chin Med J (Engl)* 117(4):542-546.
- Yang GC, Yasaei MP, Page SW. 1993. Garlic as anti-oxidant and free radical scavenger. *J Food Drug Anal* 1:357–364.
- Yeh Y, Yeh S. 1994. Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. *Lipids* 29:189–193.
- Yen HW, Lee HC, Lai WT, Sheu SH. 2007. Effects of acetylcysteine and probucol on contrast medium-induced depression of intrinsic renal glutathione peroxidase activity in diabetic rats. *Arch Med Res* 38(3):291-296.
- Yenicierioglu Y, Yilmaz O, Sarioglu S, Ormen M, Akan P, Celik A, Camsari T. 2006. Effects of N-acetylcysteine on radiocontrast nephropathy in rats. *Scand J Urol Nephrol* 40(1):63-69.
- Yokomaku Y, Sugimoto T, Kume S, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Nitta N, Haneda M, Koya D, Uzu T, Kashiwagi A. 2008. Asialoerythropoietin prevents contrast-induced nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19(2):321-328.
- Yoshida S, Hirao Y, Nakagawa S. 1984. Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic. *J Toxicol Sci* 9: 77–86.
- Yoshioka T, Fogo A, Beckman JK. 1992. Reduced activity of antioxidant enzymes underlies contrast media-induced renal injury in volume depletion. *Kidney Int* 41(4):1008-1015.