



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO EN LA NEFROPATÍA POR CICLOSPORINA A"

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA - BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

YEBEL FERRER ÁLVAREZ



MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

DICIEMBRE 2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ
VOCAL: PROF. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRÍ
SECRETARIO: PROF. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO
1er. SUPLENTE: PROF. MARTHA MENJÍVAR IRAHETA
2o SUPLENTE: PROF. DIANA BARRERA OVIEDO

Sitio donde se desarrolló el tema:

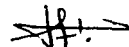
Laboratorio 209, Edificio B, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

El presente trabajo fue apoyado por CONACYT (25441-M)

Asesora: Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio



Sustentante: Yebel Ferrer Álvarez



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Yebel Ferrer

ÁLVAREZ

FECHA: 26 noviembre 2002

FIRMA: 

DEDICATORIA

A mis padres, que con su ejemplo de entrega y vocación tengo un gran reto que alcanzar.

A ti Jano, que iluminaste mi vida el día que te conocí, y por lo que nos falta aún por vivir.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de corazón a todos los integrantes del laboratorio 209 en especial a mi asesora Dra. Ma. Elena Ibarra, por su guía en la elaboración de este importante trabajo; al Dr. Pedraza, a la Dra. Menjivar, y de manera muy especial a los que también hicieron posible este sueño con sus conocimientos: Diana, Perla, Omar y Ray.

A mis amigas: Violeta, Verónica, Alejandra y Jessica por esos momentos que tanto disfruté con ustedes.

Gracias a ti Rocío, que me enseñaste a buscar donde no quería y encontré lo más maravilloso que la vida me regaló.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	5
1.1	Generalidades del riñón	5
1.2	Insuficiencia renal	7
1.3	Especies reactivas de oxígeno (ERO's)	8
1.3.1	Oxígeno singulete $^1\text{O}_2$	9
1.3.2	Anión superóxido O_2^-	9
1.3.3	Peróxido de hidrógeno H_2O_2	10
1.3.4	Radical hidroxilo OH^\cdot	10
1.3.5	Sistemas de defensa antioxidantes	10
1.4	Inmunidad	11
1.5	Ciclosporina A (CsA)	14
1.5.1	Estructura química	16
1.5.2	Farmacocinética	17
1.5.3	Mecanismo de acción	18
1.5.4	Mecanismos de nefrototoxicidad	18
1.5.5	Evidencias de la participación de las ERO's en la nefrototoxicidad por CsA	19
1.6	Ajo	21
1.6.1	Componentes	22
1.6.2	Propiedades terapéuticas	24
1.6.3	Efectos antioxidantes	24
2	JUSTIFICACIÓN	26
3	OBJETIVOS	27
4	HIPÓTESIS	28
5	MATERIAL Y MÉTODOS	29
5.1	Reactivos	29
5.2	Dieta	29
5.3	Animales	29
5.4	Diseño experimental	29
5.5	Determinaciones	30
5.5.1	Consumo de alimento y peso corporal	30
5.5.2	Marcadores glomerulares	31
5.5.3	Marcadores tubulares	33
5.5.4	Histología	35
5.6	Análisis estadístico	36
6	RESULTADOS	37
6.1	Peso corporal y consumo de alimento	37
6.2	Marcadores glomerulares	37
6.3	Marcadores tubulares	40
6.4	Análisis histológico	41
7	DISCUSIÓN	43
8	CONCLUSIONES	45
9	APÉNDICES	46
10	BIBLIOGRAFÍA	53

i. ABREVIATURAS

ADH	Hormona antiidiurética
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Células presentadoras de antígeno (<i>Antigen presenting cells</i>)
ASB	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasa
CD	Designación de grupo (<i>Cluster designation</i>)
CnA	Ciclofilina A
CnB	Ciclofilina B
CsA	Ciclosporina A
BUN	Nitrógeno de urea en sangre (<i>Blood urea nitrogen</i>)
EAE	Extracto de ajo envejecido
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético (<i>Ethilen diamino tetracetic acid</i>)
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
EE	Error estándar
GPx	Glutatión peroxidasa
GRs	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
IL-2	Interleucina 2
IRA	Insuficiencia renal aguda
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low density lipoproteins</i>)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>Major histocompatibility complex</i>)
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidasa
NFAT	Factor nuclear activador de linfocitos T
ON	Óxido nítrico
PNP	Paranitrofenol- β -D-glucosaminido
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TCR	Receptor de células T (<i>T cell receptors</i>)

ii. RESUMEN

La ciclosporina A (CsA) es el inmunosupresor de primera elección para la terapia posterior al trasplante de un órgano para evitar que éste sea rechazado. La importancia clínica de la CsA radica en su selectiva acción inhibitoria de la activación y proliferación de células T-CD4⁺ y la ausencia de la supresión de la médula ósea. Sin embargo, la administración de CsA causa, en algunos casos, efectos tóxicos principalmente en riñón e hígado. Si se pudiera proteger al paciente contra esta toxicidad aumentaría de manera importante el valor clínico de la CsA como inmunosupresor de primera elección. Existen evidencias de que las especies reactivas de oxígeno (ERO's) están involucradas en la nefropatía por CsA, y de que el extracto de ajo envejecido (EAE) posee propiedades antioxidantes, así, el EAE podría contrarrestar el daño renal causado por la CsA. Entonces, el objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto del EAE (400 µl/24 h/i.g/7 días, vehículo=solución salina isotónica) sobre la nefropatía por CsA en ratas (CsA: 30 mg/Kg/24h/s.c./7días, vehículo=aceite de oliva). Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal aproximado de 250 g, que fueron tratadas quince días después de realizarles una uninefrectomía para simular las condiciones del paciente trasplantado. Se dividieron en cuatro grupos: 1) control (Ct), 2) extracto de ajo envejecido (EAE), 3) ciclosporina A (CsA) y 4) ciclosporina A + extracto de ajo envejecido (CsA+EAE). El primer día de tratamiento se consideró como día cero (D-0) y se sacrificaron el día siete (D-7). En las muestras de orina se determinó la excreción de creatinina, proteínas totales y N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG). Los animales se sacrificaron por decapitación y en el suero recolectado se determinó creatinina, nitrógeno de urea en sangre (BUN) y actividad de glutatión peroxidasa (GPx). Con los datos de creatinina en orina y en suero se calculó la depuración de creatinina. También se realizó un estudio histológico del riñón con una tinción de hematoxilina/eosina. En cuanto a los parámetros de función glomerular, la CsA indujo un aumento en los niveles de creatinina en suero y de BUN, y una disminución en la depuración de creatinina y de la proteinuria, con esto se demostró el establecimiento de la insuficiencia renal aguda (IRA). El EAE previno totalmente las alteraciones en creatinina en suero, previno parcialmente las alteraciones en la depuración de creatinina y BUN, y no previno las alteraciones en la proteinuria, aunque ésta presenta una tendencia a mejorar. En el caso de los parámetros tubulares, la excreción urinaria de NAG se mantuvo sin alteraciones en todos los grupos, sin embargo, la actividad de la GPx sérica en las ratas tratadas con CsA disminuyó, y con la administración de EAE no se observó protección. El daño histológico inducido por la CsA se concentró principalmente en las células epiteliales de los túbulos proximales, y este daño disminuyó en las ratas tratadas con CsA+EAE. En el análisis cuantitativo del daño histológico, se observó que el porcentaje de área con vacuolas por célula que se presentó en las ratas tratadas con CsA, disminuyó significativamente en las ratas tratadas con CsA+EAE. En conclusión, se logró desarrollar el modelo experimental para establecer una insuficiencia renal aguda

inducida por CsA, y el extracto de ajo envejecido, agente antioxidante, disminuyó el daño renal inducido por la CsA, e incluso se previnieron totalmente las alteraciones en algunos parámetros.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del riñón

El riñón lleva a cabo muchas funciones importantes para el buen funcionamiento del organismo. Estas funciones se dividen en dos tipos: excretora, cuyo producto final es la orina, y la reguladora, que en gran parte está dedicada a regular el volumen y la composición de los fluidos corporales. Los siguientes puntos son algunos de los aspectos más importantes de las funciones de los riñones:

- ↪ Los riñones desempeñan un papel clave en la regulación de la composición de los líquidos orgánicos con respecto a solutos tales como sodio, potasio, cloro, carbonatos, fosfatos, calcio, glucosa, aminoácidos, urea y ácido úrico, por un complejo proceso de filtración, reabsorción y/o secreción.
- ↪ Participan, en forma importante, en el mantenimiento de un equilibrio ácido-base normal, reabsorbiendo y estabilizando el nivel de los iones bicarbonato y excretando el exceso de ácido en la orina.
- ↪ Excretan numerosas sustancias de origen endógeno y exógeno que pueden ser tóxicas.
- ↪ También presentan una función endocrina, puesto que secretan la renina, encargada de evitar una disminución en la presión arterial, y la eritropoyetina, importante para la producción de hematies. Además, desempeñan un papel clave en la síntesis del 1,25 dihidroxicolecalciferol a partir de la vitamina D, necesario para la regulación del transporte de calcio.
- ↪ Los riñones se distinguen por una alta actividad metabólica que se refleja en su gran consumo de oxígeno. Normalmente, también captan aminoácidos para la síntesis del amoníaco, y liberan glucosa en la circulación durante la inanición.

Los riñones son estructuras pares, que en humanos miden unos 10 cm de largo y tienen aproximadamente el tamaño de un puño. Se localizan justamente por debajo del diafragma, en la cavidad abdominal posterior. Al corte se distingue una sección cortical de color claro y una medular de color más oscuro. La sección cortical en el humano tiene de 5-10 mm de espesor, está formada fundamentalmente por glomérulos, y se invagina hacia la médula. La sección medular tiene forma estrellada y a partir de las papilas (vértice), se dirige hacia la corteza con el nombre de pirámides renales (Figura 1).

En el humano, los riñones están compuestos por dos millones de nefronas. La nefrona es la unidad anatómica y funcional del riñón, y hay dos tipos dependiendo de su localización: las corticales (80%), que tienen el asa de Henle corta, y las yuxtamedulares (20% restante) con asa de Henle larga (Figura 2). Cada nefrona consta de dos partes principales: un glomérulo, a través del cual se filtra la sangre, y de un túbulo renal, donde el líquido filtrado en el glomérulo se convierte en orina. El glomérulo, que se localiza en la corteza renal, es una red de capilares que se ramifican y están rodeados por la cápsula de Bowman. Los capilares glomerulares tienen una elevada presión sanguínea, lo que permite que la sangre se filtre a través de la membrana basal para formar el filtrado glomerular. Este filtrado pasa al túbulo proximal (localizado en

la corteza renal), después el líquido pasa al asa de Henle (situada en la médula renal), y posteriormente al túbulo distal (que se encuentra de nuevo en corteza renal). El túbulo distal va seguido del túbulo colector que reúne el líquido de varias nefronas, para luego vaciarse en la pelvis renal. Cuando el filtrado glomerular pasa a través de los túbulos, éstos permiten que gran parte del agua y cantidades variables de solutos se reabsorban en ellos, y el agua y los solutos que no se reabsorben, junto con las sustancias que son secretadas, forman la orina (Guyton & Hall,1997).

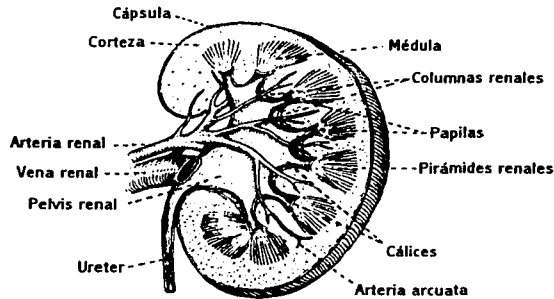


Figura 1. Diagrama de un corte longitudinal de riñón donde se muestran las principales estructuras anatómicas importantes (Brenner & Rector, 2000).

La membrana de filtración glomerular es semipermeable, de tal manera que sólo permite el paso de agua, y de los solutos cuyas moléculas son de tamaño inferior al de la seroalbúmina (18 x 75 Angstroms). En el filtrado glomerular la presión osmótica, el pH, y el contenido de sodio, potasio, cloro, urea, glucosa, bicarbonato, etc., son sensiblemente iguales que en la sangre, en lo único que se diferencian es en que el filtrado glomerular contiene una cantidad de proteínas inferior a 0.3 mg/mL y la sangre contiene una cantidad mucho mayor de proteínas (60-80 mg/mL), lo que provoca que la presión oncótica sea muy diferente y que el proceso de filtración se lleve a cabo. En el túbulo proximal se reabsorbe el 85% del agua y sodio, la totalidad de la glucosa, aminoácidos y potasio, y buena parte de fosfatos y bicarbonatos. En el asa de Henle se eleva la osmolaridad de la orina. Su rama descendente tiene elevada permeabilidad al agua y escasa permeabilidad a la mayoría de los solutos, participando así en los mecanismos de concentración de la orina. Su rama ascendente tiene una capacidad reabsortiva mucho menor que la rama descendente, y es impermeable al agua. La primera porción del túbulo distal reabsorbe con avidez la mayoría de los iones, es prácticamente impermeable al agua y a la urea, participando en la dilución del líquido tubular. La segunda mitad del túbulo distal está dividida anatómicamente en dos clases distintas de células, las células principales y las intercaladas. Las células principales reabsorben sodio y agua de la luz

y secretan iones potasio al interior de la luz. Las células intercaladas reabsorben iones potasio y secretan iones hidrógeno al interior de la luz tubular.

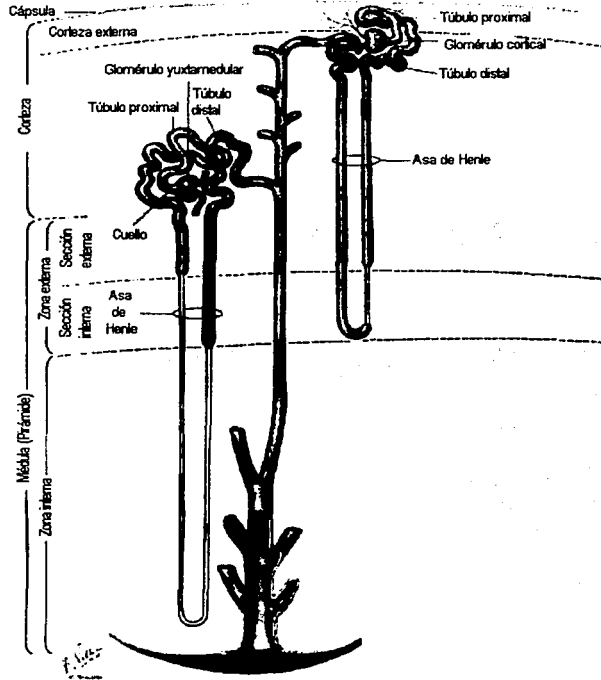


Figura 2. Esquema de la nefrona donde se muestran las estructuras anatómicas importantes (Netter, 1997).

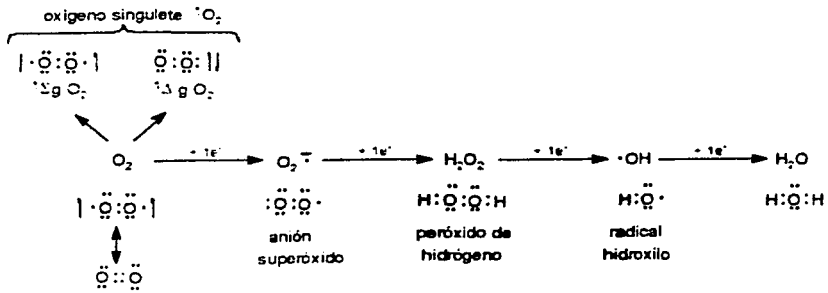
1.2 Insuficiencia renal

La insuficiencia renal puede agruparse en dos categorías principales: la insuficiencia renal aguda (IRA) que se caracteriza por una rápida disminución en la velocidad de filtración glomerular y, por lo tanto, en retención de productos de desecho que contienen nitrógeno como la creatinina y el BUN (azotemia); y en la insuficiencia renal crónica (IRC) en la que existe una pérdida progresiva de la función de las nefronas, por lo tanto, en la disminución progresiva y global de la función global que conduce a la muerte. Generalmente, la IRA es asintomática y se diagnostica con análisis bioquímicos de rutina. El riñón es un órgano con la

habilidad de recuperarse cuando sufre pérdidas en su función, y la mayor parte de los casos con IRA son reversibles (Anderson & Cockayne, 1995; Brenner & Rector, 2000). Es muy importante que la IRA se diagnostique a tiempo en aquellos pacientes que estén expuestos a un alto riesgo de desarrollarla, de lo contrario, su complicación a una insuficiencia renal crónica representa el daño irreversible, tanto funcional como estructural del riñón, lo que conlleva a la muerte.

1.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO's)

Químicamente hablando, un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados. Cualquier elemento de la tabla periódica es susceptible a convertirse en radical libre si pierde o gana un electrón. Un radical libre generalmente es muy reactivo frente a sustratos orgánicos. Los radicales libres se generan en el metabolismo normal de las células como consecuencia de factores tanto endógenos como exógenos. Dentro de los factores endógenos tenemos mecanismos enzimáticos (v. gr., xantina oxidasa, NADPH oxidasa, amina oxidasa, dihidroorato deshidrogenasa y peroxidasas), y no enzimáticos (v. gr., presencia de metales como Fe^{2+} , el complejo hemoglobina- Fe^{2+} , catecolaminas, flavinas reducidas y la coenzima Q); y dentro de los factores exógenos tenemos, por ejemplo, la exposición a radiaciones (v. gr., microondas, gamma, rayos X). Los efectos de los radicales pueden ser tanto benéficos como perjudiciales, dependiendo de las concentraciones en las que estén presentes (Maldonado, 2000). Entre las especies reactivas de mayor importancia biológica encontramos a los derivados del oxígeno, ya que éste es indispensable en los organismos aerobios. Normalmente el oxígeno consumido es reducido a agua por cuatro electrones con la ayuda de la citocromo oxidasa. Pero cuando esta reacción no es completa se forman las especies reactivas de oxígeno (ERO's), que son: el singlete de oxígeno (1O_2), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) como se muestra en la siguiente reacción:



(1)

La reducción incompleta del oxígeno es un proceso natural que sucede en el metabolismo de las células.

Es importante señalar que la naturaleza de las ERO's no en todos los casos es de radical libre, ya que existen sustancias como el peróxido de hidrógeno que no presenta esta característica (Roberfroid & Calderón, 1995). Además de su naturaleza química, las ERO's tienen diferentes valores de vida media. El peróxido de hidrógeno presenta tiempos de vida media del orden de minutos; el anión superóxido y el oxígeno singulete, del orden de microsegundos; el radical hidroxilo del orden de nanosegundos por lo que su difusión se ve limitada (Kehrer, 2000). La contribución exacta de estas especies al daño celular aún no está del todo clara, dado que pueden ser iniciadores o productos del transtorno patológico (Kehrer, 2000). A continuación se mencionan algunas de las características generales de estas ERO's.

1.3.1 Oxígeno singulete 1O_2

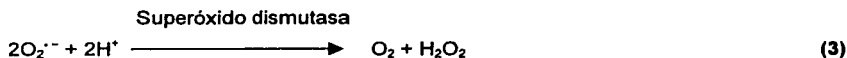
Esta especie se forma por la inversión en el spin de uno de los electrones desapareados de la molécula de oxígeno. Los electrones de spin contrarios pueden ubicarse en un solo átomo o en ambos átomos del oxígeno como se muestra en la reacción 1 (Maldonado, 2000).

1.3.2 Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

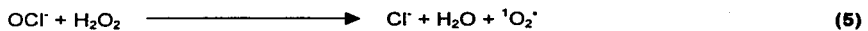
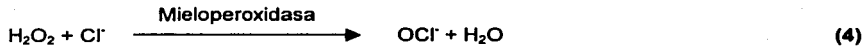
La formación del radical superóxido ocurre después de la reducción univalente del oxígeno, es decir, cuando el oxígeno acepta un electrón, reacción que se puede llevar a cabo a través de varios eventos. Esta especie es relativamente inestable y se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado, el radical hidroperoxilo (HOO^{\cdot}). El anión superóxido tiene una función muy importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas en los eventos inmunológicos (Weiss, 1986; Cohen *et al*; 1988). Cuando estas células se activan, el complejo enzimático NADPH oxidasa, localizado en la membrana citoplásmica, reduce el oxígeno de la siguiente forma:



El anión superóxido, a su vez, dismuta a peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD):



Por otra parte, la capacidad de los fagocitos para destruir bacterias radica en la formación de ácido hipocloroso, mediante la enzima mieloperoxidasa, de la siguiente manera:



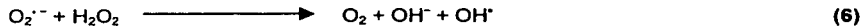
Todas estas reacciones producen y consumen una gran cantidad de metabolitos de oxígeno, y todos ellos participan en la eliminación de bacterias por parte de los fagocitos (Yu, 1994).

1.3.3 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ puede formarse espontáneamente o por la participación de la enzima SOD. Aunque no es un radical libre, cuenta con una gran lipofilidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición, para generar el radical hidroxilo. Por esta razón, se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios.

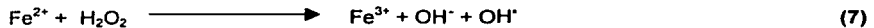
1.3.4 Radical hidroxilo (OH[•])

El radical hidroxilo es considerado una de las especies oxidantes más dañinas, por su vida media corta y alta reactividad y generalmente actúa en los sitios cercanos donde se produce. La formación del radical hidroxilo *in vitro* puede lograrse fácilmente por la reacción de Haber-Weiss entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.



Ahora bien, para que esta reacción se lleve a cabo *in vivo* se necesita un catalizador, que en este caso son los metales de transición como el hierro o el cobre, o con ciertas hemoproteínas produciendo radicales libres altamente reactivos (Kehrer, 2000).

Esta reacción se conoce como reacción de Fenton, y puede dividirse en las siguientes dos reacciones químicas (7 y 8):



Para que la reacción siempre esté alimentada de Fe²⁺, el anión superóxido reacciona con el Fe³⁺ por medio de la siguiente reacción:



La posibilidad de que la reacción Haber-Weiss o Fenton ocurra *in vivo* es un tema controversial en la bioquímica de los radicales libres, ya que no existen aún evidencias tangibles de este hecho, y los pros y contras están sustentados en experimentos *in vitro* bajo condiciones que se acercan a la realidad (Olinescu & Smith, 2002).

1.3.5 Sistemas de defensa antioxidantes

Normalmente la producción de las ERO's, anteriormente descritas, ocurre espontáneamente en organismos aerobios, y es necesaria la presencia de un sistema de defensa que contrarreste los efectos oxidantes de estas especies. Estas defensas antioxidantes pueden ser o no de naturaleza enzimática. La protección no enzimática está compuesta por moléculas liposolubles e hidrosolubles. Dentro del sistema de protección liposoluble podemos encontrar a la vitamina E (α -tocoferol) y a la vitamina A (β -carotenos); y algunos compuestos que forman parte del sistema de protección hidrosoluble son la vitamina C, el glutatión y el ácido úrico; sus propiedades se describen en la tabla 1. Todos estos compuestos poseen la capacidad de interaccionar directamente con las especies reactivas de oxígeno.

Tabla 1. Características generales de algunos compuestos que integran el sistema antioxidante no enzimático.

COMPUESTOS LIPOSOLUBLES	COMPUESTOS HIDROSOLUBLES
<p>1. Vitamina E: Es el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Por su lipofilicidad, se encuentra en las membranas biológicas. Tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en su fase de propagación (Burton, 1982; Halliwell, 2001).</p> <p>2. Vitamina A: Se encuentra en las membranas. Impide la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el singulete de oxígeno (Krinsky, 1982) y el radical hidroxilo (Halliwell, 2001).</p>	<p>1. Vitamina C: Se localiza en el citosol y en los fluidos extracelulares. Tiene la capacidad de aceptar electrones y reaccionar directamente con el anión superóxido y el radical hidroxilo (Frei, 1990).</p> <p>2. Glutatión: El glutatión reducido protege los grupos -SH de las proteínas de la acción oxidante de los radicales libres, y tiene la capacidad de reaccionar con compuestos como el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y el radical hidroxilo (Halliwell, 2001).</p> <p>3. Ácido úrico: A pesar de que es un producto final del metabolismo de las purinas en humanos, también posee propiedades antioxidantes, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual protege, algunos reportes sugieren que el ácido úrico forma complejos con metales de transición cuando interacciona con el ascorbato (Davies, 1986; Sevanian, 1985).</p>

Por otro lado, tenemos el sistema de defensa antioxidante enzimático. Entre las principales enzimas antioxidantes están la superóxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidasa. Las actividades y productos de las tres enzimas se muestran en la figura 3.

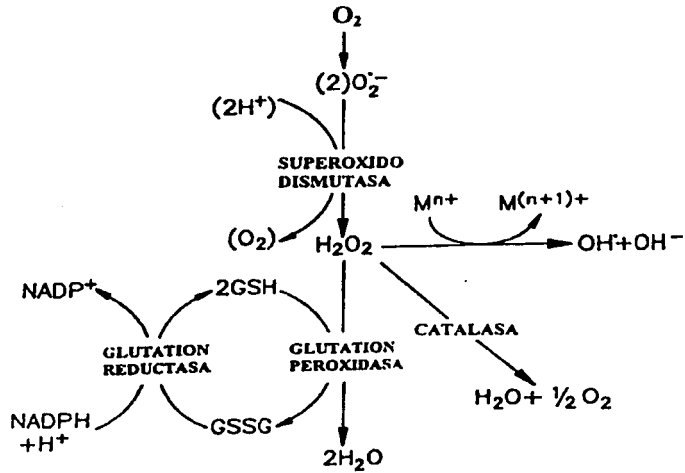
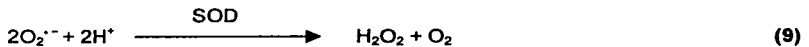


Figura 3. Cascada de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx.

a) Superóxido dismutasa (SOD)

Es una metaloenzima presente en los organismos aerobios que cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (McCord JM, 1969).

La reacción de esta metaloenzima es la siguiente:



El peróxido de hidrógeno, producto de la reacción, es tóxico por lo que esta enzima no es realmente detoxificante, pero su importancia radica en ser parte fundamental en la cascada enzimática que conduce a la inactivación completa del anión superóxido.

b) Catalasa (CAT)

Se encuentra principalmente en peroxisomas y destruye el peróxido de hidrógeno por dismutación produciendo agua y oxígeno molecular.

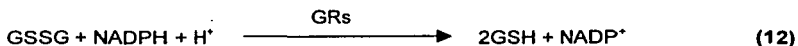


c) Glutión peroxidasa (GPx)

Es una enzima citosólica que utiliza como cofactor al Se, y transforma el peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua. Esta enzima cataliza la descomposición del H_2O_2 o de otros peróxidos orgánicos junto con la oxidación del glutión reducido (GSH) transformándose en glutión oxidado (GSSG).



El GSSG es, a su vez, reducido a GSH por la glutión reductasa (GRs) en presencia de NADPH formando un ciclo redox e impidiendo que se agoten las reservas de GSH.



Se sabe que existen cuatro tipos de GPx. GPx citosólica (Forstrom *et al.*, 1978), GPx plasmática (Yoshimura *et al.*, 1994), GPx gastrointestinal y GPx de fosfolípidos.

GPx citosólica: es una enzima que sólo tiene actividad antioxidante en casos de un incremento de H_2O_2 y de hidroperóxidos de lípidos, pero muestra una baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol.

GPx extracelular: es una enzima glicosilada, se sintetiza en riñón y pulmón, se piensa que tiene un papel importante en la protección del riñón durante el daño oxidativo (Sunde, 1990), sin embargo, su función no ha sido establecida ya que su sustrato (GSH) está en bajas concentraciones en el plasma (Chu *et al.*, 1995).

GPx gastrointestinal: se localiza principalmente en el tracto gastrointestinal de los roedores y en el humano también se ha encontrado en el hígado y colon (Chu *et al.*, 1995), se piensa que tiene un papel de protección contra efectos adversos en la ingesta de hidroperóxidos (Chu *et al.*, 1995).

GPx de fosfolípidos: es una hidropoxidasa de fosfolípidos, está unida a membranas intracelulares y tiene una menor afinidad por el GSH, su actividad se encuentra mejor preservada en casos de deficiencia de selenio, es abundante en testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (Roveri *et al.*, 1992). Se ha reportado que reduce hidroperóxidos de colesterol y al 7β -hidroperóxido de colesterol, uno de los compuestos más citotóxicos de las lipoproteínas estudiadas (Brigelius *et al.*, 1994).

En todos los casos, con excepción de la GPx de fosfolípidos que es un monómero, todas las isomorfias de GPx son tetrámeros; el riñón contiene 7.5% de la concentración total de selenio encontrado en tejidos de ratas y la actividad de la GPx en este órgano es de aproximadamente un 2% de la total.

Cuando se presenta una sobreproducción de las ERO's por encima de los sistemas de defensa, es decir, cuando ocurre un desajuste en la relación prooxidante/antioxidante de la célula, con tendencia favorable hacia el primero, la célula experimenta lo que se conoce como estrés oxidativo.

1.4 Inmunidad

La inmunidad se caracteriza por la capacidad que tiene un individuo para mantenerse libre de infecciones. Esta resistencia a las infecciones puede ser natural (inmunidad innata) o una resistencia que se puede desarrollar (inmunidad adquirida). La inmunidad natural representa la primera línea defensiva contra los microorganismos y desempeña diversas funciones importantes en la inducción de respuestas en la inmunidad adquirida. Ahora bien, la inmunidad adquirida es un mecanismo de defensa mucho más evolucionado, que es estimulado tras la exposición a agentes infecciosos, y cuya intensidad y capacidad defensivas aumentan tras la última exposición a un determinado microorganismo. La inmunidad adquirida se caracteriza por ser específica y los responsables de ésta son los linfocitos, cuyos productos son los anticuerpos. Las sustancias que inducen respuestas inmunitarias específicas se denominan antígenos (Rojas, 1996).

Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos tipos, según el componente del sistema inmunitario que participa en la respuesta (Abbas *et al.*, 1999 pp.4-7):

- 1) Respuesta inmunitaria humoral: consiste en la participación de las células llamadas linfocitos B.
- 2) Respuesta inmunitaria mediada por células o inmunidad celular: consiste en la participación de células llamadas linfocitos T.

Todos los linfocitos tienen su origen en una célula precursora de linfoides, que a su vez, deriva del precursor común a todas las células sanguíneas o célula precursora pluripotencial ubicada en la médula ósea (Figura 4).

Los linfocitos T experimentan su proceso madurativo, adquiriendo plena competencia inmunológica en el timo. En este órgano los linfocitos T adquieren una serie de receptores que permitirán su ulterior identificación (Vives & Aguilar, 1997). Éstos receptores también nos son útiles para poder distinguir las distintas poblaciones celulares, ya que sirven como marcadores celulares que pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales específicos. Se ha desarrollado un método sistemático de nomenclatura, denominado sistema CD (del inglés *cluster designation*, denominación de grupo), el cual designa grupos de

anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales se une específicamente a un determinado marcador celular. En los humanos, dentro de los linfocitos T se incluyen dos subtipos: los linfocitos T-CD4⁺ o linfocitos T cooperadores (Th) y los linfocitos T-CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos (Tc). Antigüamente se distinguían los linfocitos T de los B por su capacidad para unirse a eritrocitos de carnero, sin embargo, ahora, el mejor marcador de los linfocitos T es el receptor de las células T (TCR, del inglés, *T cell receptors*). Hay dos tipos de TCR bien definidos, el TCR-2 que es un heterodímero compuesto por dos polipéptidos (α y β) unidos por enlaces disulfuro; y el TCR-1 que presenta una estructura parecida, pero los polipéptidos que lo integran son diferentes (γ y δ). Ambos receptores se encuentran asociados a un conjunto de cinco polipéptidos, el complejo CD3, y juntos forman el complejo receptor de las células T (Roitt *et al.*, 1997).

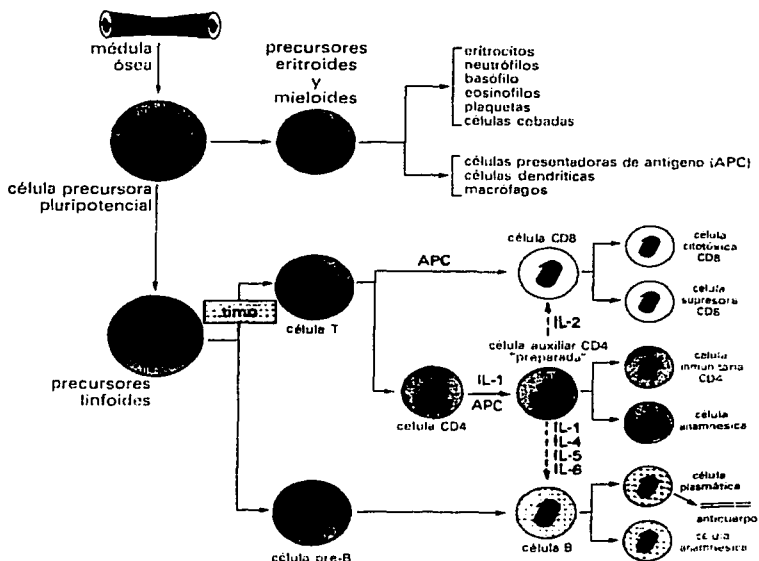


Figura 4. Esquema simplificado del origen y relación de las células que participan en la respuesta inmunitaria. Se muestra que la médula ósea genera células presentadoras de antígeno (APC: macrófagos y células dendríticas), células que participan en la inflamación, y precursores linfocíticos. Se muestra con flechas de guiones la importancia de la célula CD4 preparada o activada (célula cooperadora) con su influencia en otras células T y B. También se muestran algunas de las interleucinas (interleucina: IL-1, -2, -3, -4, -5, -6) que participan en la respuesta inmunitaria.

El reconocimiento de antígenos específicos por parte de los linfocitos T comprende un receptor en la superficie de dichas células (TCR). Para generar o inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T-CD4+, las células presentadoras de antígeno (APC) internalizan la proteína endógena activada y la

procesan generando péptidos de ocho a catorce aminoácidos de longitud (inactivada), los cuales, más tarde son ensamblados con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) clase II y expuestos en la superficie celular de la APC. La unión de receptores específicos de los linfocitos T al complejo péptido-MHC clase II, activa la célula T-CD4+ para que prolifere y con ello libere linfocinas (glucoproteínas que actúan como mediadoras en la reacción inflamatoria), las cuales son necesarias para que se originen los otros dos componentes de la respuesta inmunitaria, que son los linfocitos T citotóxicos y la respuesta de anticuerpos. El componente peptídico del MHC clase II se deriva de proteínas endógenas. Las proteínas exógenas también son expuestas en la superficie de las APC, pero se ligan a los péptidos del MHC clase I para su presentación. El reconocimiento y la unión del receptor de células T-CD8+ al complejo péptido-MHC clase I, en forma concertada con las linfocinas de las células T-CD4+ cooperadoras, hacen que se produzcan las células T citotóxicas capaces de lisar directamente células que ya han procesado al antígeno, y que además poseen en su superficie el complejo específico de péptido-MHC.

La gran mayoría de las células expresan sobre su superficie una enorme cantidad y diversidad de moléculas, unas propias de la especie, otras propias del individuo. Las diferencias antigénicas entre individuos de la misma especie, pero genéticamente distintos se restringen a las diferencias en los antígenos celulares específicos de cada individuo. Aunque todo el conjunto de diferencias antigénicas celulares podría influir en el reconocimiento y rechazo de un trasplante alogénico, es sólo un grupo de antígenos celulares el responsable fundamental del rechazo. Estos antígenos se conocen con el nombre de antígenos de histocompatibilidad. En todas las especies estudiadas, la síntesis y la expresión de los antígenos de histocompatibilidad, se encuentran bajo el control de un grupo de genes localizados en una región de un par cromosómico particular para cada especie denominada MHC. En el humano el MHC se encuentra localizado en el par cromosómico 6 (Rojas, 1996).

1.5 Ciclosporina A (CsA)

La ciclosporina A (CsA) es un potente agente inmunosupresor que se utiliza en la terapia posterior al trasplante de un órgano. En un principio, la ciclosporina sólo se utilizaba para prevenir el rechazo de órganos trasplantados, pero su uso clínico se generalizó hace aproximadamente dos décadas (1983) (Campistol & Sacks, 2000), y hoy en día datos clínicos también aseguran su eficacia en los desórdenes autoinmunes como la artritis reumatoide, la psoriasis, el síndrome nefrótico y la diabetes tipo 1 (Thaci, *et al.*, 2002; Temekonidis *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2002). Su selectiva acción inhibitoria de la activación y proliferación de células T-CD4+, y la ausencia de la supresión de la médula ósea, la caracterizaron como un fármaco ideal en la terapia de inmunosupresión. El inconveniente de la CsA es, hasta ahora, el efecto

tóxico que causa en algunos pacientes tanto en hígado como en riñón (Resch & Szamel, 1997) que, además, se ve incrementado cuando los órganos están dañados por alguna enfermedad.

1.5.1 Estructura química

La CsA es un miembro de la familia de los ciclos undecapéptidos, es una molécula lipofílica con naturaleza neutral, y con un peso molecular de 1203 kDa (Figura 5). En un principio, la CsA se extraía del hongo *Tolypocladium infantum* Gams (Henderson & Bodmer, 1996), *Tolypocladium inflatum* Gams (Kahan BD, 1989), *Hypocladium inflatum gams* (Matsuda S, 2000), pero en la actualidad se sintetiza. Los aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3 y 11 forman un sitio hidrofílico que es el responsable de la inmunosupresión de la CsA.

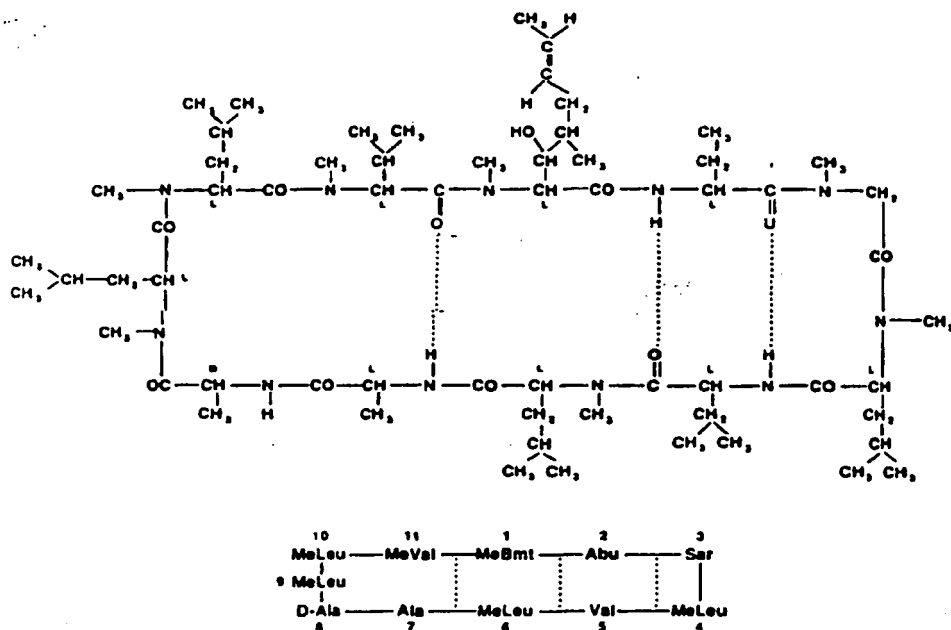


Figura 5. Estructura atómica (arriba) y alineación de los aminoácidos (abajo) de la CsA. MeBmt=aminoácido de nueve carbonos, insaturado, ((4R)-4-[(E)-2-butenil]-4,N-dimetil-L-treonina); Abu=ácido α-aminobutírico; Sar=sarcosina; MeLeu=N-metil-L-leucina; Val=valina; Ala=L-alanina; D-Ala=alanina; y MeVal=N-metil-L-valina (Kahan BD, 1989).

1.5.2 Farmacocinética

La CsA se absorbe por el tracto gastrointestinal de manera lenta, variable e incompleta (Olyaei *et al.*, 1999), o después de una administración intravenosa. Las concentraciones de la CsA en sangre disminuyen de manera bifásica. El tiempo de vida media de la primera eliminación en el plasma sanguíneo tiene un promedio de 1.2 h, y la eliminación terminal tiene un promedio de 8.4 a 27 h (Dunn *et al.*, 2001). La CsA se une a proteínas plasmáticas en un 30 a 40% (del 85 al 90% a lipoproteínas principalmente) y a tejidos como hígado, riñón y timo (50 a 60%) (Olyaei *et al.*, 1999). Es metabolizada por el sistema enzimático hepático P450 3A4 a por lo menos 30 metabolitos que se pueden encontrar en bilis, heces fecales, sangre y orina. Su principal eliminación es biliar (90%) y el resto se excreta por orina (6%), del cual el 0.1% es el fármaco intacto (no metabolizado) (Kahan BD, 1989).

1.5.3 Mecanismo de acción

Para el tratamiento contra el rechazo de transplante de un órgano existe una cantidad importante de fármacos como la ciclofosfamida, la azatioprina y el metotrexato, que disminuyen el número de linfocitos circulantes; por otro lado, están la CsA y los inmunosupresores macrólidos, que se caracterizan por prevenir la activación de los linfocitos T sin afectar su viabilidad (Resch, 1997) (Figura 6).

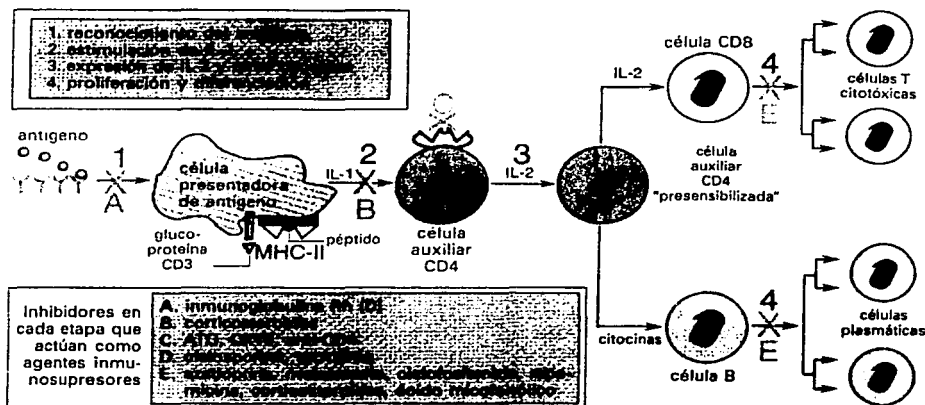


Figura 6. Sitios de acción de fármacos inmunosupresores específicos en diversas etapas de la respuesta inmunitaria. MHC= complejo principal de histocompatibilidad; IL=interleucina; AGT=globulina antitimocítica; OKT3=muromonab-CD3.

Para comprender mejor el mecanismo por el cual actúa la CsA, a continuación se describen las características principales de las moléculas que intervienen en éste:

↪ **Ciclofilina A:** es una proteína que pertenece a la familia de las inmunofilinas (Resch, 1997). La CsA se une especialmente a la ciclofilina A citosólica, la cual tiene un peso de 17kDa, es la más abundante en las células T y es ubicua (Matsuda S, 2000). Aún no se comprenden bien sus funciones naturales, pero el complejo CsA/ciclofilina inhibe a la enzima serina/treonina fosfatasa citoplasmática dependiente de Ca^{2+} /calmodulina llamada calcineurina (Abbas *et al.*, 1999).

↪ **Calcineurina:** pertenece a la superfamilia de las serina/treonina fosfatasas, está constituida por dos subunidades, la primera es la calcineurina A (CnA) que tiene actividad catalítica que defosforila al el factor nuclear de linfocitos T (NFAT), y la segunda subunidad es la calcineurina B (CnB) que tiene una función reguladora, y que a su vez esta subunidad está regulada por la relación Ca^{2+} /calmodulina (Matsuda S, 2000).

↪ **Factor nuclear activador de linfocitos T (NFAT):** es una familia de proteínas que actúan como factores específicos para linfocitos T y que se activa cuando los niveles de calcio citoplasmático aumentan. Intervienen en la transcripción de varios genes como el de la Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), entre otros (Resch, 1997).

El mecanismo de acción de la CsA aún no se comprende por completo, pero una breve explicación es la siguiente: normalmente, la activación del receptor de superficie celular de los linfocitos T (TCR) causa un incremento en el Ca^{2+} citosólico, lo que activa a la calcineurina por la vía Ca^{2+} /calmodulina (Figura 7). La calcineurina defosforila uno de sus sustratos, el NFAT, una vez defosforilado entra al núcleo y regula la transcripción de varios genes, específicamente la transcripción de Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y factor estimulador de colonias granulocíticas de macrófagos, entre otros (Abbas *et al.*, 1999; Campistol & Sacks, 2000). El papel de la CsA en este mecanismo es unirse a los receptores de la ciclofilina, lo que inhibe la activación de la calcineurina, por lo tanto, la defosforilación y regulación transcripcional por parte del sustrato de la calcineurina, el NFAT, no llega a término (Olyaei *et al.*, 1999).

1.5.4 Mecanismos de nefrotoxicidad

El mecanismo por el que la CsA causa nefrotoxicidad aún no ha sido elucidado. Se sabe que la CsA puede causar dos tipos de nefrotoxicidad: a) insuficiencia renal aguda (IRA), y b) insuficiencia renal crónica (IRC). El presente trabajo está enfocado a estudiar la primera, ya que debe evitarse que el daño provocado

por la IRA aumente hasta ser IRC, donde las posibilidades de regeneración de las células del riñón son nulas.

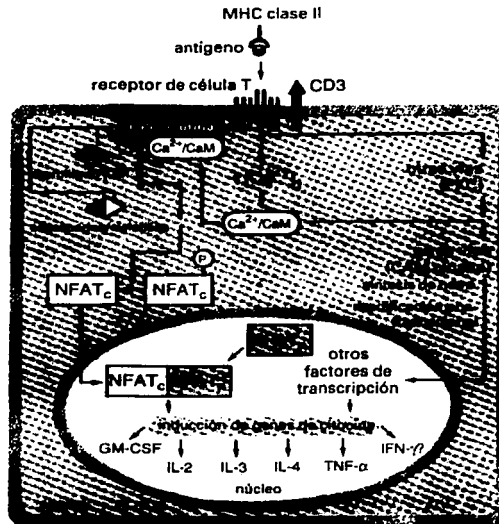


Figura 7. Mecanismo de acción de la CsA. La CsA se difunde fácilmente en el citoplasma de las células blanco. Entre las vías que inhibe está la transducción de señales activadas por los receptores de células T. La activación del receptor de células T incrementa el calcio intracelular, que activa la fosfatasa de serina/treonina dependiente de dicho mineral, conocida como calcineurina. Un sustrato de la calcineurina es el componente citosólico llamado factor nuclear activador de linfocitos T (NFATc) al cual desfosforila. Una vez desfosforilado puede entrar al núcleo y al asociarse con otros componentes nucleares de NFAT (NFATn), regula la transcripción de muchos genes que incluyen los que codifican la Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el interferón γ (INF- γ) y otras interleucinas. MHC=complejo principal de histocompatibilidad; CaM=calmodulina; PKC=proteína quinasa C (del inglés *protein kinase C*) (Goodman & Gilman, 1996).

La administración de CsA causa vasoconstricción en las arteriolas aferentes (Campistol & Sacks, 2000; Ferguson *et al.*, 1993; Mathieson, 2000; Romano *et al.*, 2000) que da por resultado una disminución en el flujo renal sanguíneo efectivo (Remuzzi & Perico, 1995), una mala filtración por parte del glomérulo, que se manifiesta por un incremento en los niveles de creatinina (Andoh *et al.*, 1997), y un aumento en la resistencia vascular renal (Olyaei *et al.*, 1999). Los cambios en la hemodinámica y la función renales están relacionados con la dosis y son reversibles cuando se suspende la administración de CsA (Campistol & Sacks, 2000; Ferguson *et al.*, 1993; Franceschini *et al.*, 1998; Mathieson, 2000; Romano *et al.*, 2000); esto se ha comprobado tanto en animales como en humanos (Olyaei *et al.*, 1999). Las posibles causas de los cambios vasculares pueden ser: aumento en el tono simpático, activación del sistema renina-angiotensina,

disminución en la producción de moléculas vasodilatadoras como el óxido nítrico y algunas prostaglandinas, y/o aumento en la producción de moléculas vasoconstrictoras como los troboxanos (Campistol & Sacks, 2000).

1.5.5 Evidencias de la participación de las ERO's en la nefrotoxicidad por CsA

Existen evidencias recientes en las que se involucra la presencia de ERO's y metabolitos del nitrógeno en la patogénesis de la nefrotoxicidad inducida por CsA. Algunos estudios demuestran que la administración de CsA genera la producción de peróxido de hidrógeno en células mesangiales (células presentes en el glomérulo y que se encargan de la contracción del mismo) (Pérez de Lema *et al.*, 1998), y aumento en la generación del anión superóxido y peróxido de hidrógeno en el glomérulo (Parra *et al.*, 1998). También hay evidencias que sugieren que el citocromo P450 juega un papel en la generación de oxidantes, funcionando como donador de hierro, generando así ERO's (Ahmed *et al.*, 1995; Serino *et al.*, 1993). Por otro lado, también se ha visto que el sistema de defensa antioxidante del riñón se ve afectado por la CsA, ya que reduce los niveles de glutatión y vitamina E (Inselmann *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1986; al Khader *et al.*, 1996). La disminución del glutatión puede deberse a la inhibición de la actividad de la glutatión S-transferasa, reduciendo el mecanismo de detoxificación del glutatión (Hoffman *et al.*, 1995). El efecto benéfico de los atrapadores de las ERO's y de los antioxidantes también provee evidencias de la participación de las ERO's en la nefrotoxicidad por CsA. Con la administración de antioxidantes como la vitamina E (Inselmann *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1995) y el glutatión (Serino *et al.*, 1993) hay una reducción considerable de la lipoperoxidación y de la toxicidad renal inducida por CsA. Resulta más contundente aún, que el aumento en la lipoperoxidación y en el daño renal es mayor cuando se administra CsA en animales con deficiencia en su sistema antioxidante (Wang *et al.*, 1995) y con bajos niveles de glutatión (Inselmann *et al.*, 1994). La vasoconstricción glomerular que provoca una marcada reducción en el flujo de filtración glomerular, disminuye con la administración de SOD o CAT (Wolf *et al.*, 1994a). El resumen de las evidencias del papel de las ERO's en la nefrotoxicidad inducida por la CsA se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Evidencias que sugieren el papel de las ERO's en la nefrotoxicidad inducida por la CsA.

-
- La CsA aumenta la generación de peróxido de hidrógeno *in vitro* (Parra *et al.*, 1998; Pérez de Lema *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1994a; Wolf *et al.*, 1994b) e *in vivo* (Ahmed *et al.*, 1995; Serino *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1998).
 - La CsA induce aumento en la lipoperoxidación, disminución del NADPH y del citocromo P450 y una disminución en la relación del glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) en la corteza renal, microsomas o mitocondrias tanto *in vitro* como *in vivo* (Inselmann *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1986; Walker *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1995).
-

-
- ✓ La SOD o la CAT pueden evitar la disminución de la función renal inducida por CsA (Wolf *et al.*, 1994a).
 - ✓ La CsA reduce los niveles de glutatión y otros antioxidantes endógenos (al Khader *et al.*, 1996), y la administración exógena de antioxidantes como la vitamina E (Inselmann *et al.*, 1988; Kanji *et al.*, 1999; Kriysztopik *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995;) o como el glutatión reducido (Serino *et al.*, 1993) disminuyen considerablemente los efectos dañinos de la CsA.
 - ✓ Ratas con deficiencia en antioxidantes presentan mayor lipoperoxidación y daño renal que una rata normal cuando son tratadas con CsA (Wang *et al.*, 1995).
 - ✓ La CsA aumenta la cantidad de radicales libres en la orina, los que generan lipoperoxidación, la cual disminuye con la administración de vitamina E (Zhong *et al.*, 1998).
-

Independientemente de su origen, las ERO's pueden dañar la membrana basal glomerular y alterar las funciones tubulares y glomerulares (Baud & Raymond, 1986). Aún no se sabe bien el papel que juega el óxido nítrico (ON) o sus metabolitos en el desarrollo de la nefrotoxicidad por CsA. En el caso de la IRA, existen evidencias de que el ON puede ser benéfico por su acción vasodilatadora que contrarresta la vasoconstricción renal causada por algunas sustancias como la angiotensina II y los troboxanos (López-Ongil *et al.*, 1996; Bobadilla *et al.*, 1998), que pueden estar participando en la vasoconstricción generada por la CsA.

1.6 Ajo

1.6.1 Componentes

El ajo es miembro de la familia *Liliaceae*, su nombre científico es *Allium sativum* y se encuentra entre las plantas más cultivadas desde la antigüedad; es rico en compuestos azufrados y es uno de los vegetales que contienen niveles elevados de selenio (Block *et al.*, 1996). Los principales agentes activos del ajo son la alicina, el ajoene y el dialilsulfuro (compuestos sulfurados) (Figura 8), pero también se han estudiado muchos otros (Block, 1985). Estos compuestos pueden ser obtenidos dependiendo del tipo de extracción a la que se someta el ajo.

La alicina (ácido dialiltiosulfínico u óxido de dialildisulfuro), es el principal constituyente odorífero característico del ajo, que está presente sólo en el ajo fresco y en polvo, no así en el aceite o en el macerado. Además de este compuesto, también están presentes el metilalil tiosulfinato y el alilmetiltiosulfinato, los cuales son liberados del bulbo del ajo fresco después de que su tejido es triturado o cortado (Block, 1985).

En el interior del ajo se encuentran la aliina (inodora) y la alinasa, pero físicamente éstas no están en contacto, ya que la alinasa, se encuentra compartimentalizada y sólo cuando el ajo sufre un daño mecánico, la enzima entra en contacto con la aliina convirtiéndola en alicina, la cual es convertida en compuestos organosulfurados fuertemente olorosos (Block, 1985) (Figura 9).

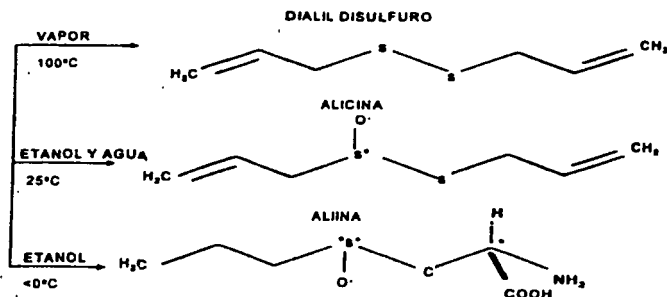


Figura 8. Diferentes compuestos sulfurados extraídos del ajo dependiendo del tratamiento que se utilice. El * indica centros quirales (Block, 1985).

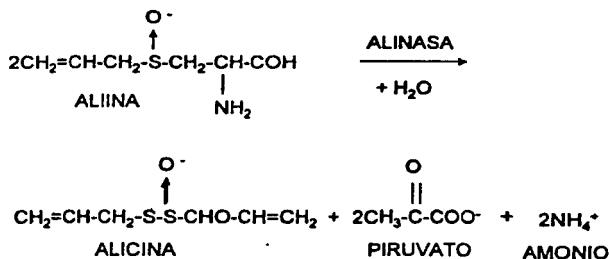


Figura 9. Formación de la alicina a partir de la aliina por acción de la alinasa (Block, 1985).

Al combinarse tres moléculas de alicina se producen dos moléculas de ajoene (Block, 1985, Augusti & Sheela, 1996). Los sulfuros, disulfuros y trisulfuros han sido estudiados para determinar qué papel juegan en varias rutas metabólicas, en particular en aquellas de detoxificación. La conjugación de agentes químicos tóxicos con glutatión y conjugados de cisteína es, al parecer, la principal defensa celular contra el daño tóxico (Dausch & Nixon, 1990). En un estudio se comprobó la estabilidad térmica de los extractos de

ajo, encontrándose que su actividad de atrapador del OH^{*} sólo disminuye un 10% cuando éstos se someten a temperaturas de cocción (Prasad *et al.*, 1996), lo que le confiere al ajo una mayor versatilidad en su uso. El extracto de ajo envejecido (EAE), que es el que nos compete en esta investigación, está formado por los constituyentes solubles en agua del ajo y una pequeña cantidad de compuestos solubles en aceite (Weinberg *et al.*, 1993). El extracto se caracteriza por contener compuestos sulfurados solubles en agua, incluyendo la S-alil-cisteína y el S-alil-mercaptocisteína (Imai *et al.*, 1994). La forma en la que se procesa el EAE es diferente a las tres extracciones mencionadas anteriormente. Como su nombre lo dice el extracto se envejece por más de 20 meses. El proceso de envejecimiento ayuda a convertir los compuestos olorosos, fuertes e irritantes en compuestos sulfurados estables y seguros (Amagase *et al.*, 2001).

1.6.2 Propiedades terapéuticas

En 1858, Louis Pasteur informó que el ajo tenía propiedades antibacterianas. Más tarde Albert Schweitzer observó que era útil en el tratamiento contra disentería amebiana, y también se informó que el jugo de ajo diluido 1:125,000 inhibía el desarrollo de ciertas bacterias (Block, 1985). Por otra parte, posee también cualidades antitrombóticas y antivirales (Bordia *et al.*, 1996; Salazar *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 1992). Junto con las otras preparaciones del ajo, el EAE posee propiedades hepatoprotectoras, anticancerígenas y quimiopreventivas. Además, el EAE muestra actividades antioxidantes, mientras que el ajo crudo o cocido estimula la oxidación (Imai *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha descrito que el ajo (Rietz *et al.*, 1993) y algunos dipéptidos aislados y caracterizados en el extracto acuoso de ajo (Suetsuna, 1998) inhiben a la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), la cual es una enzima muy importante en la regulación de la presión arterial originando el octapéptido angiotensina II, el cual es un vasoconstrictor muy potente. Así mismo, en la literatura está reportado que el EAE comercial (Kyolic), que se utilizó en el presente trabajo, disminuye el colesterol y los triglicéridos en suero en pacientes hiperlipidémicos (Lau *et al.*, 1987; Rahman, 2001). El daño por la lipoperoxidación causado por las ERO's parece ser la principal causa de muchas enfermedades, incluso de la arteriosclerosis. Ide *et al.* (1997) reportaron que el EAE inhibe la modificación oxidativa de las LDL disminuyendo o previniendo de esta forma la arteriosclerosis. También se ha reportado una reducción significativa, por el EAE, en la agregación plaquetaria y en los niveles de tromboxano B2 circulantes (que posee un gran efecto agregante y vasoconstrictor) (Rahman, 2001; Salazar *et al.*, 2001; Steiner *et al.*, 1998).

1.6.3 Efectos antioxidantes

Algunas evidencias de los efectos antioxidantes del ajo se mencionan a continuación:

1. Los extractos etanólicos de ajo previenen la lipoperoxidación de biomembranas (microsomas hepáticos), inducida a través de radicales libres por el ácido ascórbico *in vitro* (Horie *et al.*, 1989).

2. Los extractos de ajo envejecido, cuyos principales componentes son la S-alil-cisteína y S-alil-mercaptocisteína, inhiben la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico inducidas por el t-butil hidroperóxido en fracciones microsomales en hígado *in vitro* (Imai *et al.*, 1994).
3. Los compuestos organosulfurados del extracto de ajo envejecido son eficaces para atrapar el H₂O₂ e inhibir la lipoperoxidación (Ide *et al.*, 1996).
4. En las células del endotelio vascular tratadas con extractos de ajo envejecido, existe un incremento dependiente de la dosis y del tiempo en las actividades de SOD, CAT y GPx lo cual puede explicar la disminución de H₂O₂ en estos cultivos (Wei & Lau, 1997).
5. Una dieta con ajo en ratas con nefrotoxicidad por gentamicina, disminuye o previene las alteraciones tubulares y glomerulares (Pedraza *et al.*, 2000).
6. La generación de peróxido de hidrógeno disminuye en ratas tratadas con una dieta de ajo, muy probablemente por un efecto antioxidante directo del ajo (Pedraza *et al.*, 2001).

2 JUSTIFICACIÓN

La gran eficacia inmunosupresora de la CsA es muy importante en la terapia contra el rechazo de órganos transplantados, pues se ha demostrado que el tratamiento con CsA aumenta en la supervivencia de los pacientes sometidos a este tipo de cirugías en comparación con otros inmunosupresores. La desventaja que la CsA presenta en cuanto a toxicidad es el principal obstáculo para su administración. Existen evidencias claras de que la nefrotoxicidad producida, se genera por la formación de ERO's. Por lo tanto, resulta de gran interés investigar si la administración de un antioxidante, como el EAE, el cual tiene bajo costo, es accesible y de uso generalizado, puede disminuir los efectos nefrotóxicos de la CsA.

3 OBJETIVOS

3.1 Desarrollar un modelo experimental para establecer una insuficiencia renal aguda por CsA.

3.2 Investigar si el extracto de ajo envejecido, agente antioxidante, evita o disminuye este daño.

4 HIPÓTESIS

Si el daño renal inducido por la CsA está relacionado con la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO's), es de esperar que el extracto de ajo envejecido, agente antioxidante, proteja contra el daño renal.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

El p-nitrofenol, el p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamínido, la albúmina sérica bovina, el NADPH, la glutatión reductasa, el glutatión reducido y el trítón X-100 fueron de Sigma Chemical Co (St Louis, MO). La ciclosporina A (CsA) que se usó fue la presentación comercial Sandimmun® Neoral® con solución microemulsionada en cápsulas de 100 mg de Novartis (México, D.F.). Para las determinaciones de creatinina y de nitrógeno de urea se usaron estuches de Spinreact (España, Santa Coloma). Las sales de fosfatos para los amortiguadores, el carbonato de sodio, el ácido tricloroacético, el éter y el EDTA-Na₂ fueron de J.T. Baker (México, D.F.). El peróxido de hidrógeno fue de Mallinckrodt (México, D.F.). La azida de sodio fue de Merck (México, D.F.). El extracto de ajo envejecido utilizado para este estudio fue KYOLIC Liquid Aged Garlic Extract™. Las suturas utilizadas fueron 3-0 Silk (2 Metric) Black Braided T-5 26mm de Sherwood Davis & Geck.

5.2 Dieta

Como dieta se utilizó alimento global para roedor 2018 de Harlan (México, D.F.).

5.3 Animales

Las ratas que se utilizaron para el presente trabajo fueron machos de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250 g, y se adquirieron y mantuvieron en el bioterio del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

5.4 Diseño experimental

En base a la literatura (Bobadilla *et al.*, 1994; Mihatsch, 1986) y después de varias pruebas piloto se decidió el siguiente diseño experimental: dos semanas antes del estudio los animales se sometieron a uninefrectomía para simular las condiciones del paciente transplantado (Bobadilla *et al.*, 1998; Mihatsch, 1986). La cirugía se realizó en condiciones de asepsia y las ratas fueron anestesiadas con éter al 99.9%. Se hizo una incisión en la parte superior del vientre de las ratas, se localizó el riñón izquierdo, se desencapsuló y el flujo sanguíneo de las arterias y venas de dicho riñón fue obstruido amarrándolas con el hilo de las suturas; en seguida, los vasos sanguíneos fueron seccionados para extraer el riñón suturando posteriormente la herida. Las ratas se observaron durante 15 días después de la cirugía para cuidar que tuvieran una buena evolución post-quirúrgica, y al cabo de este tiempo se inició el tratamiento. Los animales se dividieron en cuatro grupos: 1) CONTROL (Ct): ratas tratadas con aceite de oliva (vehículo de la CsA) y con solución salina isotónica (vehículo del EAE); 2) EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO (EAE): ratas tratadas con aceite de oliva y con EAE; 3) CICLOSPORINA A (CsA): ratas tratadas con CsA y

solución salina isotónica; y 4) CICLOSPORINA A + EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO (CsA+EAE); ratas tratadas con Ciclosporina A y extracto de ajo envejecido. Cada grupo estuvo formado por 12-13 ratas.

La administración de los tratamientos fue en el orden, vía de administración y dosis que se describe a continuación: el EAE se administró intragástricamente (400 μ l) cada 24 horas para lo cual se utilizó una jeringa de insulina a la que se le adaptó una manguera de látex de calibre 0.86mm y de una longitud aproximada de 8 cm; la CsA se administró subcutáneamente en una dosis de 30 mg de CsA/Kg de peso también cada 24 horas. Las ratas a las que no se les administró EAE y/o CsA se les inyectó, respectivamente, solución salina isotónica (400 μ l) y/o aceite de oliva (el volumen promedio que se inyectaba diariamente a las ratas tratadas con CsA) por las mismas vías de administración. Todas las ratas tuvieron libre acceso al agua de beber. El grupo tratado con CsA fue alimentado *ad libitum* y los demás grupos fueron alimentados a la par, es decir, se les dio de comer la cantidad promedio de alimento ingerido por el grupo CsA, ya que está reportado en la literatura que las ratas tratadas con este medicamento disminuyen su consumo de alimento (Bobadilla *et al.*, 1999; Mihatsch, 1986), comportamiento también observado en protocolos anteriores realizados en nuestro laboratorio. Al primer día de tratamiento le llamamos día cero (D-0) y dicho tratamiento tuvo un seguimiento durante 7 días.

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas dos días antes del tratamiento para recolectar, el primer y último día, la orina de 24 horas. A esta muestra se le midió el volumen, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos y se dividió en alícuotas que se almacenaron a -70°C hasta la realización de las determinaciones. Los animales se sacrificaron por decapitación a los siete días y se recolectó la sangre. El riñón derecho se extrajo rápidamente y se realizó un corte transversal de aproximadamente 1 mm de grosor que se fijó en 1 ml de solución de formaldehído al 10%, para posteriormente utilizarlo en los estudios histológicos. Las muestras de sangre se dejaron reposar aproximadamente 30 minutos con el fin de que se retrajera el coágulo del paquete globular y separar el suero para lo cual las muestras se centrifugaron a 500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, el sobrenadante (suero) se almacenó en alícuotas en tubos eppendorf a -20°C hasta la realización de las determinaciones correspondientes.

5.5 Determinaciones

En esta sección sólo se describen los fundamentos teóricos de las técnicas utilizadas, si se requiere consultar las técnicas con mayor detalle, éstas se encuentran en la sección de apéndices.

5.5.1 Consumo de alimento y peso corporal

El consumo de alimento y el peso corporal de los cuatro grupos fueron registrados diariamente.

5.5.2 Marcadores glomerulares

Para comprobar el daño glomerular se determinó creatinina en suero, depuración de creatinina, BUN y proteinuria.

5.5.2.1 Creatinina en suero y depuración de creatinina

La fuente de la creatinina sérica es la creatina y la creatina fosfato del músculo, una mayor masa muscular originará una mayor cantidad de creatinina en suero. Los niveles de creatinina sérica constituyen un índice de utilidad para el funcionamiento renal principalmente respecto a la filtración glomerular, debido a la constancia con que se forma y se excreta. Las determinaciones de creatinina sérica son mucho más confiables que las de BUN, principalmente debido a la relativa independencia de las proteínas que se ingieren en la dieta, al grado de hidratación del paciente y al metabolismo protéico; sin embargo, es poco útil para detectar graves afecciones de la velocidad de filtración glomerular. Así que, para obtener una mayor sensibilidad se debe efectuar una prueba de depuración de creatinina, ya que ésta es filtrada libremente por el glomérulo y no es reabsorbida en los túbulos (Anderson & Cockayne, 1995; Pesce *et al.*, 1990).

La creatinina se determinó espectrofotométricamente mediante la reacción de Jaffé, utilizando un estuche comercial de Spinreact. En esta reacción, la creatinina presente en la muestra forma un complejo colorido con el picrato en un medio alcalino. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra. Este es un método cinético que minimiza la interferencia con otros cromógenos inespecíficos.



En cada ensayo se prepara un tubo para cada muestra, otro con agua en lugar de muestra como blanco y uno más con una solución estándar de creatinina (1.48 mg/dL), a cada uno de estos tubos se les adiciona mezcla reactiva (ácido pícrico e hidróxido de sodio) justo antes del momento en que se lee la muestra. Una vez preparados los tubos, el espectrofotómetro se calibra a ceros con el blanco y enseguida se leen el estándar y las muestras. Las absorbencias se determinan a los 30 y 90 segundos (Abs_{90-30}) a una longitud de onda de 492 nm. Para calcular la concentración de creatinina en las muestras se usa la siguiente fórmula: $\{(Abs_{90} - Abs_{30}) \text{ de la muestra} / (Abs_{90} - Abs_{30}) \text{ del estándar}\} * \text{concentración del estándar (mg/dL)}$. El resultado de este cálculo queda en mg/dL. Con los datos de la concentración de creatinina en suero y en orina, se calcula la depuración de la creatinina usando la siguiente fórmula: $(CREA_o * VU) / (CREA_s * 1440)$, donde $CREA_o$ es la concentración de creatinina en la orina, expresada en mg/dL, VU es el volumen urinario en 24 h expresado en mL, $CREA_s$ es la concentración de creatinina en el suero,

expresada en mg/dL, y 1440 son los minutos que hay en 24 h. El resultado obtenido se corrigió por cada 100 g de peso del animal, así, la depuración de la creatinina se expresa en mL/min/100g. La técnica detallada está descrita en el apéndice 1.

5.5.2.2 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

La urea es sintetizada en el hígado como producto final del catabolismo de los aminoácidos. Es filtrada libremente por el glomérulo, aunque 40 a 50% es reabsorbida por los túbulos proximales. Debido a su metabolismo, es un indicador no específico de la función renal. Los niveles de urea en sangre varían en forma proporcional con el contenido de la dieta, el catabolismo de las proteínas durante la degradación tisular y la función hepática. Esta determinación es muy útil para el seguimiento de un proceso renal (Pesce *et al.*, 1990).

El BUN se midió con un kit de Spinreact que se basa en una adaptación de la reacción propuesta por Jung *et al.*, 1975, que consiste en la reacción de la urea con el ortoftaldehído en medio ácido.



El producto de esta reacción, la isoindolina, se acopla a una quinolina compleja formando un cromógeno que se mide a 510 nm (Pesce *et al.*, 1990).



La reacción es de punto final en la que el blanco se prepara con el reactivo 1 (ortoftaldehído) más el reactivo 2 (solución borato); el estándar se prepara con solución estándar (solución urea, 50 mg/dL) más reactivos 1 y 2; y la muestra se prepara con los mismos reactivos que el estándar. El BUN de las muestras se calcula con la siguiente fórmula: $\{(\text{Abs de la muestra}/\text{Abs del estándar}) * \text{concentración del estándar}\}/2.14$, el 2.14 es el factor que se utiliza para expresar la urea obtenida en el ensayo como el nitrógeno contenido en la urea de la sangre. Entonces, el resultado se representa la concentración de BUN en la muestra en mg/dL. La técnica detallada está descrita en el apéndice 2.

5.5.2.3 Proteinuria

Generalmente en una enfermedad renal se detectan más proteínas en orina de las que usualmente pueden aparecer, sin embargo, con este tratamiento la excreción urinaria disminuye debido a que la CsA causa una vasoconstricción en las arteriolas aferentes (Campistol *et al.*, 2000; Ferguson, 1993; Mathieson, 2000; Romano, 2000), que da por resultado una disminución de la filtración por parte del glomérulo (Andoh, 1997), es por eso que esta determinación se incluyó como marcador glomerular.

Las proteínas totales en orina se determinaron por el método turbidimétrico, en la que se precipitan las proteínas de la orina formando una suspensión fina. Esto se logra usando un agente desnaturizante como el ácido tricloroacético (TCA) que es un solvente orgánico. Esta suspensión se lee en el espectrofotómetro a 420 nm. Para llevar a cabo la determinación se prepara una curva estándar en el rango de 0.04 a 0.8 mg de proteína/mL a partir de una solución de albúmina sérica bovina al 0.1%, y dos tubos para cada muestra, el primero que es el blanco, contiene muestra más agua desionizada, y el segundo que es el problema, contiene muestra más TCA. Todos los tubos se leen a 420 nm en el espectrofotómetro. Para obtener la cantidad de proteínas excretadas en la orina, se interpola la absorbencia de las muestras y del blanco en la curva patrón para tener sus concentraciones en mg/mL, enseguida se calcula la diferencia entre la concentración de la muestra menos la del blanco, se multiplica por la dilución que se realizó a la muestra (1:5) y el resultado se multiplica por la cantidad de orina en mL obtenidos durante 24 horas. La proteinuria se reporta, por lo tanto, como mg de proteína/ 24 horas. La técnica detallada está descrita en el apéndice 3.

5.5.3 Marcadores tubulares

Para comprobar el daño tubular se determinó excreción urinaria de NAG y actividad de GPx.

5.5.3.1 Excreción urinaria de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG)

La NAG es una enzima lisosomal de las células tubulares proximales que es ampliamente aceptada como marcador de daño tubular porque el incremento de ésta en la orina se origina por el daño estructural estas células (Molitoris & Finn, 2001; Marchewka, 1999). Esta enzima libera paranitrofenol del sustrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminido que a pH ácido se encuentra protonado y es incoloro (Figura 10). Con carbonato de sodio se alcaliniza el medio a pH 10.4, permitiendo alcanzar el pKa del p-nitrofenol para que se transforme en su forma aniónica que absorbe a 405 nm.

ACTIVIDAD DE LA NAG

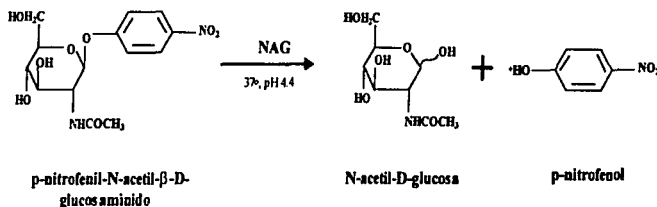
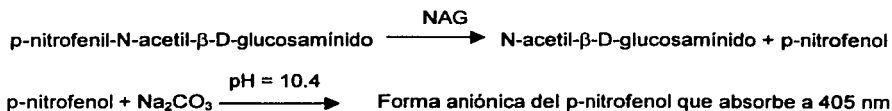


Figura 10. Reacción de la NAG en presencia de su sustrato en medio ácido.



Para la determinación de la NAG se prepara una curva estándar en el rango de 5 a 175 nmoles de paranitrofenol, en seguida se preparan cuatro tubos, el primer tubo es el problema y contiene muestra, amortiguador de citratos y sustrato; el segundo es el blanco con muestra y amortiguador de citratos; el tercero es el de la hidrólisis inespecífica que contiene amortiguador de citratos, agua y sustrato, se debe colocar un tubo de éstos al principio y otro al final del ensayo y nos es útil para monitorear la degradación (hidrólisis) que sufre el sustrato por la luz y el tiempo; y finalmente, el blanco de comparación que contiene amortiguador de citratos y agua solamente. Todos los tubos se incuban durante 15 minutos a 37°C, y al cabo de este tiempo se adiciona carbonato de sodio con el fin de detener la reacción y alcalinizar el medio, de esta forma el p-nitrofenol se transforma en su forma aniónica. Enseguida se leen los tubos a 405 nm en el espectrofotómetro. Para calcular la cantidad de NAG excretada se interpolan los valores de absorbencia en la curva para obtener los nmoles de p-nitrofenol/0.05 mL de las muestras y de la hidrólisis inespecífica. Se hace un promedio de las dos determinaciones de hidrólisis inespecífica y se resta este promedio a cada muestra. Después se expresan los valores en nmoles de p-nitrofenol/mL/min. Para esto se multiplica por 20 (para pasar de 0.05 mL de muestra que se colocaron en el ensayo a 1.0 mL) y se divide entre 15 (para pasar de 15 min para expresar los resultados por minuto de incubación en los que se llevó a cabo la reacción). Para expresar la excreción total de la enzima en μ moles de p-nitrofenol/mL/min/24 horas (U/24h) se multiplica por el volumen urinario obtenido en 24 horas (expresado en mL) y se divide entre 1000 para pasar de nmoles a μ moles. La técnica detallada está descrita en el apéndice 4.

5.5.3.2 Actividad de GPx en suero

La GPx que se encuentra en circulación es sintetizada y liberada principalmente por el riñón. Se piensa que tiene un papel protector durante el daño oxidativo en este órgano. La disminución de la GPx sérica se considera un indicador de daño a túbulo proximal ya que en una IRA hay daño tubular (Lawrence & Burk, 1976).

La actividad de la GPx se midió de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa que se basa en la disminución de la absorbencia a 340 nm debido a la desaparición de NADPH. La GPx al reducir los hidroperóxidos consume glutatión reducido, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir del glutatión oxidado, proceso que consume NADPH (Figura 11).

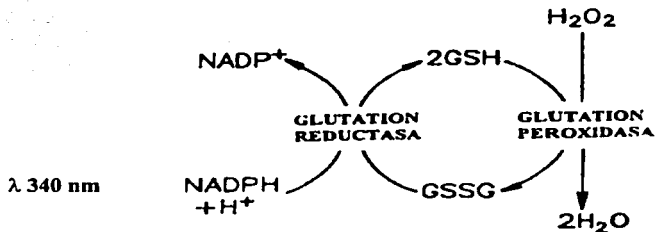


Figura 11. Catálisis del peróxido de hidrógeno a agua por medio de la GPx, utilizando como cofactor GSH. El GSSG es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor, el cual absorbe a 340 nm.

Para determinar la actividad de esta enzima entonces se prepara el sustrato que contiene agua y peróxido de hidrógeno y una solución llamada mezcla reactiva que contiene EDTA disódico, azida de sodio, NADPH, glutatión reducido, glutatión reductasa y amortiguador de fosfatos pH 7.0 que son todos los reactivos que la enzima requiere para trabajar en óptimas condiciones; ya que están listos el sustrato y la mezcla reactiva, se prepara el blanco con agua, mezcla reactiva y sustrato; la muestra se prepara con suero, mezcla reactiva y sustrato, y se lee inmediatamente, antes de preparar otra muestra. Las lecturas son a 340 nm cada minuto durante tres minutos en el espectrofotómetro. La actividad de la glutatión peroxidasa se calcula promediando los cambios de absorbencia por minuto y multiplicando este promedio por 0.16. Este factor se obtiene partiendo de la ley de Lambert y Beer: $A = c \times \epsilon \times l$, donde A es absorbencia; c es la concentración; ϵ es el coeficiente de absorción milimolar del NADPH cuyo valor a 340 nm es de $6.22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; y l es la longitud de la celda en cm. Entonces, si despejamos c y sustituimos ϵ obtenemos: $c = \Delta A \times 0.16 \mu\text{mol/mL}$. Así se obtiene la actividad de GPx expresada en U/mL, donde 1 U = μmol de NADPH oxidado/min. La técnica detallada está descrita en el apéndice 5.

5.5.4 Histología

Después de sacrificar a las ratas, se extrajo el riñón inmediatamente y se obtuvo un corte transversal (2 mm aproximadamente), que se fijó en 800 μl de una solución de formaldehído al 10%. Posteriormente, este corte se deshidrató gradualmente en alcohol y luego se embebió en parafina. Con un microtomo se obtuvieron cortes de 3 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina/eosina (H&E).

La cuantificación del daño histológico se determinó usando un analizador de imágenes Leica Qwin (Cambridge, England). Se realizó el perfil histológico de 30 túbulos proximales por rata seleccionados al

azar (8-10 ratas por grupo experimental). Para ello, se midió el área total (μm^2) y el área ocupada por las células epiteliales con alteraciones histológicas como inflamación, vacuolización citoplásmica, descamación y necrosis. De esta manera, se calculó el porcentaje del área tubular afectada. La técnica detallada está descrita en el apéndice 6.

5.6 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm error estándar ($\bar{x} \pm EE$). Los datos se analizaron con el programa Prism 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante ANOVA de una o dos vías y comparaciones múltiples de Tukey, o *t* de Student pareada, según el caso. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6 RESULTADOS:

6.1 Peso corporal y consumo de alimento:

En la figura 12 se muestra el comportamiento del consumo de alimento (A) y del peso corporal (B) de los diferentes grupos estudiados. En el grupo CsA, el consumo de alimento disminuye y, por lo tanto, el peso corporal, como está reportado en la literatura (Bobadilla *et al.*, 1999; Mihatsch, 1986) y como lo hemos observado en protocolos anteriores en nuestro laboratorio. Al hacer el análisis estadístico, ambos parámetros disminuyen significativamente al final del tratamiento (D-7) con respecto a los valores iniciales (D-0) (*t* de student pareada $p < 0.05$). Como los demás grupos están alimentados a la par, el peso corporal y el consumo de alimento, se comportan de manera similar. En el comportamiento a lo largo del tiempo tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio (ANOVA de dos vías $p > 0.05$). Es importante señalar que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas del peso corporal y el consumo de alimento entre los grupos de estudio en el día 7 (ANOVA de una vía $p > 0.05$). La relevancia de esto radica en que todos los grupos están bajo las mismas condiciones, de tal manera que los resultados de las determinaciones bioquímicas y enzimáticas se deberán exclusivamente a los tratamientos a los que fueron sometidos los animales y no a diferencias en el consumo de alimento y/o al peso corporal.

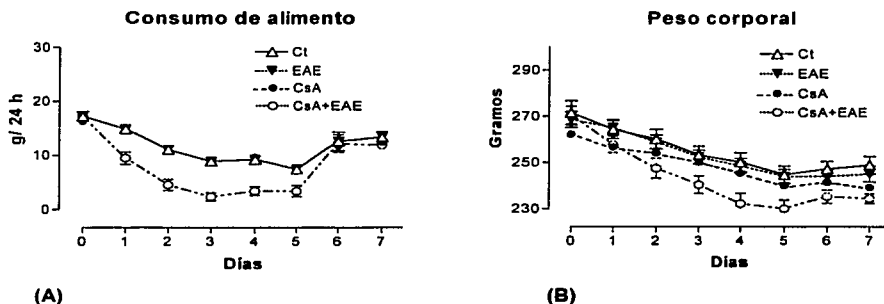


Figura 12. Comportamiento del consumo de alimento (A) y del peso corporal (B) en los diferentes grupos estudiados. Ct = grupo control, EAE = grupo tratado con extracto de ajo envejecido, CsA = grupo tratado con ciclosporina A, CsA+EAE = grupo tratado con ciclosporina A más extracto de ajo envejecido. $n = 12-13$. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

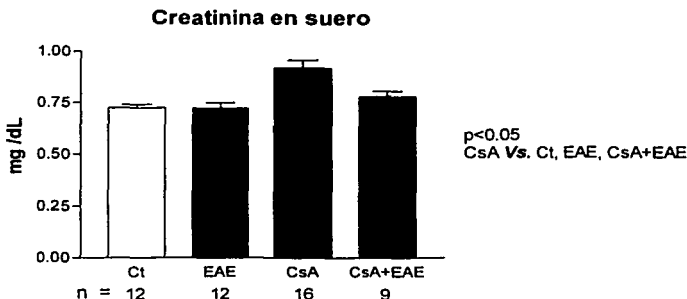
6.2 Marcadores glomerulares:

6.2.1 Creatinina en suero y depuración de creatinina:

En los valores de creatinina en suero, hubo un incremento estadísticamente significativo en el grupo tratado con CsA comparado con el control (Figura 13). Asimismo, la depuración de creatinina disminuyó un 37.7% (Figura 14), demostrándose de esta manera el establecimiento del daño renal inducido por el tratamiento con CsA. En las ratas tratadas con CsA+EAE se previno totalmente el efecto de la CsA sobre el

nivel de la creatinina en suero, ya que estadísticamente el grupo CsA+EAE no es diferente con respecto al control y si es diferente con respecto al grupo CsA, mostrándose en esta determinación la protección del EAE sobre el daño renal causado por la CsA; sin embargo, con la depuración de creatinina no ocurre así, ya que el grupo CsA+EAE, a pesar de que muestra una tendencia a aumentar la depuración, sus valores no alcanzan los niveles del grupo control y no son estadísticamente diferentes del grupo con CsA. El EAE *per se* no indujo alteraciones de estos marcadores.

Figura 13. Concentración de creatinina en suero en el día 7 en los diferentes grupos estudiados. Ct = grupo control,



EAE = grupo tratado con extracto de ajo envejecido, CsA = grupo tratado con ciclosporina A, CsA+EAE = grupo tratado con ciclosporina A más extracto de ajo envejecido. El número de determinaciones de cada grupo se muestra debajo de las barras. ANOVA de una vía, Tukey. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

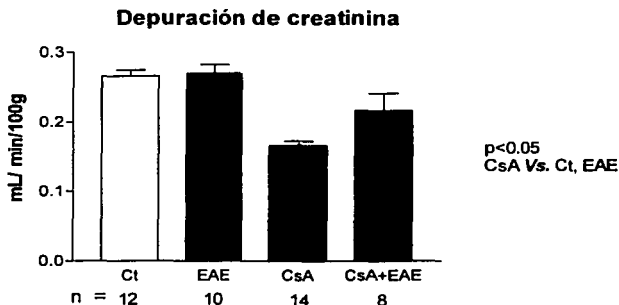


Figura 14. Depuración de creatinina en el día 7 en los diferentes grupos estudiados. Ct = grupo control, EAE = grupo tratado con extracto de ajo envejecido, CsA = grupo tratado con ciclosporina A, CsA+EAE = grupo tratado con ciclosporina A más extracto de ajo envejecido. El número de determinaciones de cada grupo se muestra debajo de las barras. ANOVA de una vía, Tukey. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

6.2.2 Nitrógeno de urea en sangre (BUN):

El tratamiento con CsA indujo un incremento de un 45.9% en el nivel del BUN con respecto al grupo control (Figura 15). Junto con la creatinina, estos resultados ponen de manifiesto el daño renal glomerular causado por el tratamiento con CsA. En el grupo con CsA+EAE se previno parcialmente este incremento, ya que fue un 18.5% menor al encontrado en las ratas tratadas con CsA, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre estos dos grupos; sin embargo, el grupo CsA+EAE también es estadísticamente diferente del grupo control.

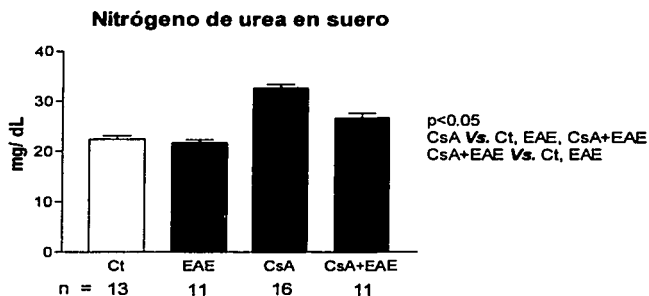


Figura 15. Concentración de nitrógeno de urea en suero en el día 7 en los diferentes grupos estudiados. Ct = grupo control, EAE = grupo tratado con extracto de ajo envejecido, CsA = grupo tratado con ciclosporina A, CsA+EAE = grupo tratado con ciclosporina A más extracto de ajo envejecido. El número de determinaciones de cada grupo se muestra debajo de las barras. ANOVA de una vía, Tukey. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

6.2.3 Proteinuria:

La proteinuria del grupo tratado con EAE no cambia con respecto al grupo control, lo que nos indica que el EAE *per se* no altera la excreción de proteínas en orina (Figura 16). Con el tratamiento con CsA se indujo una disminución en la excreción de proteínas de un 88.3% con respecto al grupo control, la cual es estadísticamente significativa. Esta disminución no se previno en el grupo CsA+EAE ya que no hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CsA; sin embargo, podemos notar una cierta protección ya que la disminución no es tan marcada (64.9%) como en el grupo con CsA.

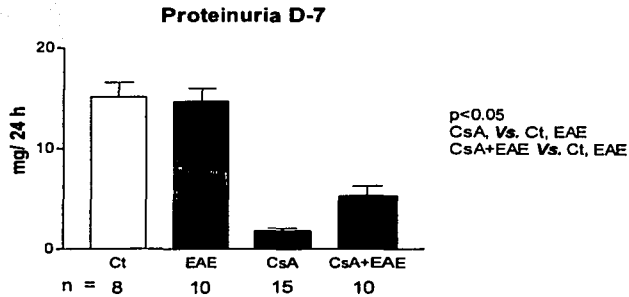


Figura 16. Excreción de proteínas en el día 7 del tratamiento en los diferentes grupos estudiados. Ct = grupo control, EAE = grupo tratado con extracto de ajo envejecido, CsA = grupo tratado con ciclosporina A, CsA+EAE = grupo tratado con ciclosporina A más extracto de ajo envejecido. El número de determinaciones de cada grupo se muestra debajo de las barras. ANOVA de una vía, Tukey. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

6.3 Marcadores tubulares:

6.3.1 Excreción urinaria de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG):

En la figura 17 se puede observar que la excreción urinaria de la NAG en el tratamiento con CsA, permaneció sin alteraciones significativas en todas los grupos.

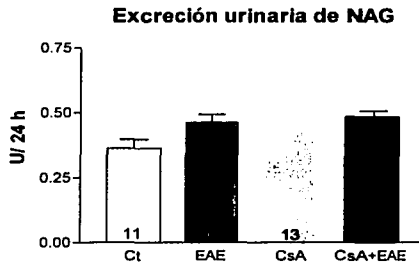


Figura 17. Excreción de la enzima NAG en orina en el día 7 en los diferentes grupos estudiados. Ct = grupo control, EAE = grupo tratado con extracto de ajo envejecido, CsA = grupo tratado con ciclosporina A, CsA+EAE = grupo tratado con ciclosporina A más extracto de ajo envejecido. El número de determinaciones de cada grupo se muestra debajo de las barras. ANOVA de una vía, Tukey. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

6.3.2 GPx en suero:

La actividad de GPx en suero disminuye un 48.6% en el tratamiento con CsA comparada con la actividad en el grupo control (Figura 18), y esta disminución no se revierte con el tratamiento con CsA+EAE. El EAE *per se* no induce alteraciones de este marcador.

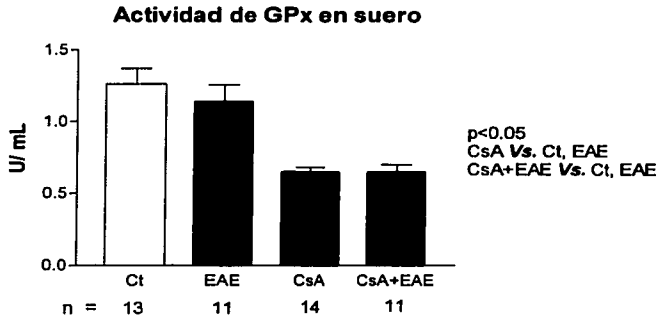


Figura 18. Actividad de la enzima GPx en suero en el día 7 en los diferentes grupos estudiados. Ct = grupo control, EAE = grupo tratado con extracto de ajo envejecido, CsA = grupo tratado con ciclosporina A, CsA+EAE = grupo tratado con ciclosporina A más extracto de ajo envejecido. El número de determinaciones de cada grupo se muestra debajo de las barras. ANOVA de una vía, Tukey. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

6.4 Análisis histológico:

En la figura 19 se muestran imágenes representativas del análisis histológico de todos los grupos estudiados. No se observaron alteraciones histológicas en los túbulos de las ratas con EAE (Figura 19 B). En la imagen de la rata tratada con CsA (Figura 19 C) se observa inflamación, vacuolización y detritis característicos de la necrosis en las células epiteliales de los túbulos proximales (Figura 19 A). En las ratas tratadas con CsA+EAE, el daño tubular inducido por la CsA es menor (Figura 19 D). Los túbulos proximales están más dañados que los glomérulos y los túbulos distales.

En la figura 20 podemos ver el análisis cuantitativo del estudio histológico donde se puede observar la protección que confirió el EAE sobre el efecto de la CsA, ya que el porcentaje de área con vacuolas por célula en el grupo tratado con CsA+EAE fue de 9.62% comparado con un 11.51% del grupo con CsA, y la diferencia de estos porcentajes es estadísticamente significativa.

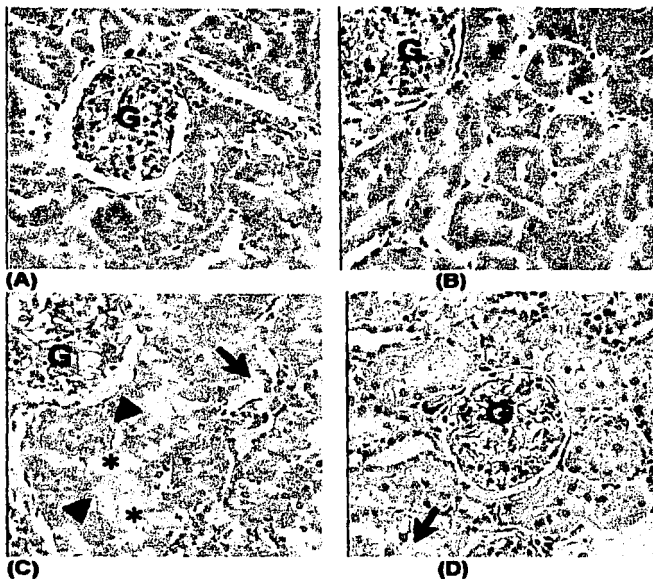


Figura 19. imágenes representativas del análisis histológico. Las letras pertenecen a los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los grupos: (A) rata control, (B) rata tratada con EAE, (C) rata tratada con CsA, y (D) rata tratada con CsA+EAE. Tinción con H&E 200X, La G representa el glomerulo, el asterisco son las vacuolas, las cabezas de flecha son la inflamación y las flechas son *debris*.

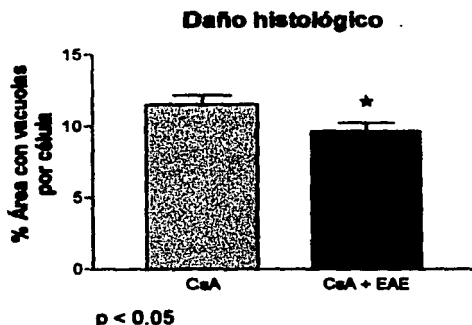


Figura 20. Efecto del EAE sobre el daño histológico inducido por CsA a los 7 días en los grupos tratados con CsA y CsA+EAE. $n = 47$. t de student. Los datos están expresados como $\bar{x} \pm EE$.

7 DISCUSIÓN:

Como ya se describió en los resultados, el consumo de alimento y el peso corporal disminuyen en las ratas tratadas con CsA lo que coincide con las observaciones de otros autores (Bobadilla *et al.*, 1994, 1998; Mihatsch, 1986; Schmid *et al.*, 1993), y es por esto que los demás grupos fueron alimentados a la par en el presente trabajo. El análisis estadístico de estos parámetros nos revela que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo cual es importante, ya que indica que los grupos estudiados se encuentran bajo las mismas condiciones, y de esta manera se puede asegurar que los resultados de las pruebas bioquímicas y enzimáticas se deben única y exclusivamente a los tratamientos a los que fueron sometidos los diferentes grupos y no a los efectos de la CsA sobre el peso corporal y la ingesta de alimento.

El incremento en los niveles de creatinina sérica y BUN, la presencia de daño histológico y la disminución de la depuración de creatinina, proteinuria y actividad de GPx en suero, son prueba del daño renal, es decir, se logró el establecimiento de la IRA. Los valores obtenidos para creatinina en suero y BUN son consistentes con los resultados obtenidos por Clarke *et al.*, 1999 y por Zima *et al.*, 1998. La disminución en los niveles de GPx sérica puede deberse al daño funcional que sufren las células de los túbulos proximales, ya que la GPx sérica se sintetiza, en su gran mayoría, en estas células. Por otro lado, la evaluación de la NAG es ampliamente aceptada como marcador de daño tubular, ya que normalmente, esta enzima se encuentra dentro de los lisosomas de los túbulos proximales, y cuando ocurre un daño estructural en estas células, la excreción de NAG en la orina aumenta, es decir, para que esta excreción se presente en grandes cantidades es necesario que ocurra necrosis en las células de los túbulos proximales (Marchewka, 1999). La razón por la que en este proyecto no encontramos aumento en los niveles de este marcador, podría ser que el daño estructural, como se puede ver en los estudios histológicos, no es tan marcado a nivel de necrosis en los túbulos proximales. De hecho, otros autores han encontrado un aumento en la excreción urinaria de NAG muy pequeño y es detectable sólo a los doce días de tratamiento (Pfaller *et al.*, 1986; Schmid *et al.*, 1993; Whiting *et al.*, 1982, 1986) y en el presente trabajo los estudios se realizaron a los siete días de tratamiento. Además, está documentado que en pacientes trasplantados, los niveles de este marcador sólo aumentan durante los primeros días después de realizarse el trasplante debido a la lesión isquémica del riñón, o tiempo después, en caso de que ocurra un rechazo al trasplante (Marchewka, 1999).

Está ampliamente demostrado que la CsA tiene efectos vasoconstrictores en las arteriolas aferentes (Campistol *et al.*, 2000; Ferguson, 1993; Mathieson, 2000; Romano, 2000), lo que da por resultado una disminución en el flujo sanguíneo efectivo (Remuzzi, 1995), una disminución de la filtración por parte del glomérulo, que se manifiesta por un incremento en los niveles de creatinina (Andoh, 1997), y un aumento en la resistencia vascular renal (Olayei *et al.*, 1999). Todas estas alteraciones pueden disminuir la

eliminación normal de las proteínas, es por eso que en el presente trabajo se ha clasificado a la proteinuria como un marcador de daño funcional glomerular.

El efecto del EAE sobre las diferentes determinaciones se presentó de la siguiente manera: el aumento en los niveles séricos de creatinina inducido por la CsA se previno totalmente con el EAE, y el aumento en el BUN y el daño renal observado en los estudios histológicos se previno parcialmente con la administración del EAE. En cambio, la disminución en la proteinuria inducida por la CsA no se previno con este antioxidante, pero si se observa que el grupo tratado con CsA+EAE mejora en comparación con el grupo CsA, ya que hay una disminución en los niveles de proteinuria de 88.3% en el grupo con CsA comparado con un 64.9% en el grupo con CsA+EAE. Así mismo, la disminución en los niveles de GPx sérica en el grupo con CsA, tampoco se previno con la administración de EAE.

Como ya se mencionó en la introducción, el EAE cuenta con propiedades antioxidantes, el hecho de que el EAE haya evitado total o parcialmente las alteraciones en algunas determinaciones realizadas, es una evidencia más de que el daño renal inducido por la CsA está mediado por la generación de ERO's, como lo han propuesto otros autores (Ahmed *et al.*, 1995; Serino *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1998, 1999). Por otro lado, el que se hayan encontrado algunas determinaciones en las que no se obtuvo protección, podría deberse a que la dosis de EAE administrada no fue suficiente para prevenir por completo el daño glomerular y tubular. Para obtener una protección total sería importante evaluar este modelo de IRA, con un aumento en la dosis del EAE, y/o modificar los tiempos en los que se administra, es decir, por ejemplo, que los animales reciban el EAE durante dos semanas antes de recibir el tratamiento con CsA, como lo han hecho Pedraza *et al.* (2001) en otro modelo de IRA. Estos autores han observado que el tratamiento con una dieta de ajo induce una disminución en el daño renal, tanto funcional como estructural, inducido por gentamicina. En el mecanismo del daño por este antibiótico están involucradas las ERO's, al igual que en la nefropatía por CsA (Ahmed *et al.*, 1995; Serino *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1998, 1999). Además, estos mismos autores (Pedraza *et al.*, 2000) han demostrado la disminución en la generación de peróxido de hidrógeno en ratas tratadas con una dieta de ajo al 2%, muy probablemente, por el efecto antioxidante del ajo, por lo que es probable que el EAE en el modelo de IRA por CsA también esté induciendo la protección por sus capacidades antioxidantes.

8 CONCLUSIONES

8.1 Se logró desarrollar el modelo experimental para establecer una insuficiencia renal aguda causada por CsA.

8.2 El extracto de ajo envejecido, agente antioxidante, disminuyó el daño renal inducido por la CsA, e incluso en algunos marcadores se previno totalmente.

9 APÉNDICES

En esta sección están descritas las técnicas exactamente como se montaron para el presente trabajo. En el capítulo de "Material y métodos" está el fundamento teórico y el procedimiento para calcular los resultados de cada una.

APÉNDICE 1

Creatinina en orina y suero:

Reactivos:

Se usan reactivos de un estuche comercial (Spinreact) # de catálogo 1001111:

Reactivo 1	Ácido pícrico	17.5 mmol/L
Reactivo 2	Hidróxido de sodio	0.29 mol/L
Estándar	Creatinina	2.0 mg/dL

Mezcla reactiva: Se mezclan los reactivos 1 y 2 en una proporción 1:1, y la solución es estable durante 10 días a temperatura ambiente. La cantidad de mezcla a preparar se calcula tomando en cuenta el número de muestras a procesar, el estándar y el blanco. Se puede usar suero o plasma heparinizado, y orina.

Muestra:

La orina de las ratas se recolecta a temperatura ambiente por un período de 24 horas, se centrifuga a 2500 rpm por 10 min., se requieren 50 μ L de orina.

Técnica cinética:

	Blanco	Estándar	Muestra
Suero u orina	---	---	50 μ L
Estándar	---	50 μ L	---
Mezcla reactiva	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Agua	50 μ L	---	---

En un tubo colocar el estándar o la muestra más la mezcla reactiva, agitar perfectamente con el vortex lo más rápido posible, el contenido se vierte en la celdilla (en este momento comenzar las lecturas en el espectrofotómetro) y se toman las lecturas de D.O. a 492 nm a los 30 (E₁), 60 y 90 (E₂) segundos.

APÉNDICE 2

Nitrógeno de urea en sangre (BUN):

Reactivos:

Se usan reactivos de un estuche comercial (Spinreact) # Cat 1001325:

Reactivo 1	Ortoftaldehído	4.8 mmol/L
Reactivo 2	Solución borato	87 mmol/L
Estándar	Solución urea	50 mmol/dL

Técnica de punto final:

	Blanco	Estándar	Muestra
Muestra	----	----	10 μ L
Reactivo 1	400 μ L	400 μ L	400 μ L
Estándar	----	10 μ L	----

Mezclar perfectamente y añadir a todos los tubos 400 μ L de Reactivo 2 cada 30 o 60 segundo (dependiendo de la habilidad de cada persona para leer los tubos al finalizar el tiempo de incubación) e inmediatamente se incubaba a 37°C durante 15 min:

Se lee en el espectrofotómetro a 510 nm calibrando a cero con el blanco.

APÉNDICE 3

Proteínas totales en orina:

Las proteínas totales en orina se midieron por el método turbidimétrico en el que se usa ácido tricloroacético (TCA) (Pedraza-Chaverrí *et al.*, 1999).

Reactivos:

Albumina sérica bovina (ASB) al 0.1% (p/v) en agua destilada

Sigma Chemical A4503

Ácido tricloroacético (TCA) al 12.5% (p/v) en agua destilada

JTBaker 0414-01

Muestra:

La orina de las ratas se recolecta a temperatura ambiente por un periodo de 24 horas, se centrifuga a 2500 rpm por 10 min.

Técnica:

➤ Preparar una curva estándar de la siguiente manera:

[ASB] mg/mL	ASB 0.1% (μ L)	H ₂ O (μ L)
Blanco	0	1000
0.04	40	960
0.1	100	900
0.2	200	800
0.4	400	600
0.6	600	400
0.8	800	200

➤ Colocar 1 mL de cada muestra (por duplicado).

➤ Adicionar 0.25 mL de TCA al 12.5% a una de las réplicas y a todos los tubos de la curva estándar, incluido el blanco.

➤ Adicionar 0.25 mL de agua a la otra réplica (blanco de cada muestra).

➤ Agitar en vórtex brevemente para que las proteínas queden perfectamente suspendidas.

➤ Leer a 420 nm frente al blanco. NOTA: Es muy importante agitar los tubos justo antes de leer su D.O.

APÉNDICE 4

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

Reactivos:

Citrato trisódico $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Sigma Chemical 6448
Carbonato de sodio Na_2CO_3	JTBaker 3604-01
p-nitrofenil-β-D-glucosaminido	Sigma Chemical N-9376
p-nitrofenol	Sigma Chemical N-104-8

Soluciones:

1. Amortiguador de citratos 0.05 M , pH 4.4:

Pesar 14.7 g de citrato de sodio y disolver en 900 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl concentrado (aproximadamente 1 mL) y aforar a 1 litro. Guardar en refrigeración en frasco ámbar.

2. Carbonato de sodio 0.2 M, pH 10.4:

Pesar 10.6 g de carbonato de sodio y disolver en 400 mL de agua, ajustar el pH a 10.4 con HCl concentrado (aproximadamente 1 mL). Aforar a 500 mL. Guardar en refrigeración.

3. Paranitrofenil β-D-glucosaminido (PNP) 30 mM (sustrato):

Pesar 0.1026 g de PNP y disolver en 10 mL de amortiguador de citratos 0.05 M pH 4.4. Disolver calentando y protegiendo de la luz. Es recomendable calentar previamente el amortiguador y mezclar con micropipeta de 1 mL para disolver más rápido.

NOTA: Si el sustrato se sobrecalienta se hidroliza y ya no es útil. Esto se puede ver si la solución se torna amarilla cuando está caliente, si se enfría se vuelve incolora, precipita y ya no sirve. Para probar que el sustrato disuelto no está hidrolizado poner en un tubo 0.5 mL de amortiguador de citratos más 0.5 mL de amortiguador de carbonatos más 0.1 mL del sustrato recién disuelto. Si se torna amarillo significa que está hidrolizado y **NO DEBE USARSE EN EL ENSAYO**. La concentración final del sustrato en la mezcla de reacción es 6.8 mM. Se están agregando 7.5 μmoles de sustrato al adicionar 0.25 mL de una solución con una concentración 30 mM.

4. p-nitrofenol 0.5 mM:

Pesar 0.007 g de p-nitrofenol y disolver en 100 mL de amortiguador de citratos 0.05 M, pH 4.4. almacenar a 4°C.

Muestra:

La orina de las ratas se recolecta a temperatura ambiente por un periodo de 24 horas, se centrifuga a 2500 rpm por 10 min., se requieren 0.1 mL de orina.

Técnica:

Curva estándar:

nmoles de p-nitrofenol	μL de p-nitrofenol 0.5 mM	μL de amortiguador de citratos 0.05 M, pH 4.4	μL de amortiguador de carbonatos pH 10.4
0	0	1100	1100
5	10	1090	1100
10	20	1080	1100
20	40	1060	1100
40	80	1020	1100
80	160	940	1100
175	350	750	1100

Los siguientes valores son los de una curva que nos puede servir como modelo. $R=0.9998$, $m=0.007989$, $b = -0.0144$. No es necesario incubar los tubos de esta curva.

Preparación de las muestras: se deben preparar todos los tubos de acuerdo a la siguiente tabla. El sustrato, se coloca en el momento de empezar el ensayo con un intervalo de 15 segundos entre tubo y tubo, como se describe más adelante.

	Blanco de la hidrólisis no enzimática	Hidrólisis no enzimática	Blanco de cada problema	Problema
Amortiguador de citratos 0.05 M, pH 4.4 (mL)	0.50	0.375	0.50	0.375
Orina (mL)	-	-	0.05	0.05
Agua (mL)	0.05	0.05	-	-
Sustrato 30 mM (mL)	-	0.125	-	0.125

Se deben incluir un tubos de hidrólisis no enzimática, con su respectivo blanco, al inicio y otro al final de los tubos problema.

- ↪ Colocar los tubos en el baño a 37°C (previamente preparado).
- ↪ Enseguida se debe preparar el sustrato, probar que no esté hidrolizado, como se describió anteriormente, y agregar a los tubos antes de que se enfríe y precipite, con una diferencia entre cada tubo de 15 segundos. Inmediatamente después de que se agrega el sustrato el tubo se agitan en vortex.
- ↪ Iniciar el reloj cuando se adicione el sustrato a la primera muestra.
- ↪ Incubar 15 min a 37°C .
- ↪ Sin sacar la muestras del baño, detener la reacción con 0.55 mL de carbonato de sodio 0.2 M pH 10.4 y agitar los tubos de uno en uno. Nota: se adiciona primero a los tubos problema y después a los blanco de cada problema.

Leer la D.O. a 405 nm. (Se calibra a cero con el blanco de cada muestra con el propósito de no restar manualmente ese valor).

APÉNDICE 5

Glutación peroxidasa (GPx) en suero:

Reactivos:

EDTANa ₂	JTBaker 8993
Azida de sodio	Merck 822335
NADPH	Sigma Chemical N-1630
Glutación reductasa	Sigma Chemical G-4751*
Glutación reducido	Sigma Chemical G-6529 o G-4251

Peróxido de hidrógeno.

Mallinckrodt 5240

* La actividad de la enzima varía de lote a lote, en este caso 9.2 mg prot/mL (170 U/mg prot).

Soluciones:

Para llevar a cabo esta técnica se debe preparar una mezcla de reacción. A continuación se muestran las cantidades de los diferentes reactivos que hay que adicionar dependiendo de la cantidad a preparar que, a su vez, depende del número de muestras que se vayan a determinar, tomando en cuenta que se requieren 800 µL por cada muestra.

Mezcla de reacción:

	25 mL (31 tubos)	32 mL (40 tubos)	50 mL (62 tubos)	Conc. final
EDTANa ₂	0.0093 g	0.0119 g	0.0186 g	1 mM
Azida de sodio	0.00165 g	0.0021 g	0.0033 g	1 mM
NADPH	0.00415 g	0.0065 g	0.0083 g	0.2 mM
Glutatión reducido	0.0077 g	0.0098 g	0.0154 g	1 mM
Glutatión reductasa *	*	*	*	1U/mL
Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0	cbp 25 mL	cbp 32 mL	cbp 50 mL	

Preparar y usar el mismo día del ensayo.

* Cálculos para la adición de glutatión reductasa (concentración final = 1U/mL):

Para saber la cantidad de enzima que se tiene que agregar en el ensayo, es necesario tener en cuenta que la concentración final debe ser 1U/mL, y que cada lote de glutatión reductasa tiene una actividad específica diferente. Por ejemplo, para el lote G-4751 hay 9.2 mg prot/mL (170 U/mg prot), para preparar 15 mL entonces necesito 15 U, el cálculo se realiza de la siguiente forma:

$$15 \text{ U} \times \frac{1 \text{ mg prot}}{170 \text{ U}} \times \frac{1 \text{ mL}}{9.2 \text{ mg prot}} = 0.0096 \text{ mL} \text{ o } 9.6 \text{ } \mu\text{L} \text{ de enzima para agregar a la mezcla de reacción}$$

Una vez preparada la mezcla de reacción debe mantenerse en hielo durante el ensayo.

Solución del sustrato:

10 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 + 2 µL de H₂C₂ al 30%. Este volumen de 10 mL es suficiente para 100 tubos (0.1 mL/tubo). La solución se mantiene a temperatura ambiente durante el ensayo. Se prepara antes de comenzar el ensayo.

Técnica:

- El suero se diluye 1:8 con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0.
- Blanco: amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0 (para calibrar a cero).
- Actividad específica:

Colocar en una celdilla 100 µL de la solución sustrato.

Mezclar 100 µL de amortiguador de fosfato 50 mM pH 7.0 + 800 µL de la mezcla de reacción.

Incubar por 5 min a temperatura ambiente.

Adicionar todo el volumen a una celdilla que contiene 100 μL de la solución sustrato y se inicia el registro a 340 nm durante 3 minutos a intervalos de 1 min.

☛ **Muestras:**

Colocar en una celdilla 100 μL de la solución sustrato.

Mezclar 100 μL de la muestra diluida + 800 μL de la mezcla de reacción

Incubar 5 min a temperatura ambiente

Vaciar todo el volumen a una celdilla que contiene 100 μL de la solución sustrato y se inicia el registro a 340 nm durante 3 minutos a intervalos de 1 min.

APÉNDICE 6

Histología:

Soluciones:

Etanol	Eosina/hematoxilina
Xilol	Ácido clorhídrico 1%
Parafina	Cloruro de Litio
Silano	Resina

Para deshidratar y teñir los cortes de riñón se siguieron los pasos que a continuación se describen:

A) La muestra debe incluirse de la siguiente forma:

1. Tratar a muestra con etanol al 100%, durante una hora, y se hacen tres cambios.
2. Enseguida, tratar con xilol al 100%, durante una hora, también tres veces.
3. Fundir la parafina y la muestra se trata en ella durante una hora también por tres veces.
4. Colocar la muestra en la parafina definitiva y dejar enfriar.

B) Una vez incluida la muestra, se procede a realizar los cortes:

1. Dejar enfriar los bloques.
2. Cortar el bloque con un microtomo en rebanadas con un espesor de 3-5 μm .
3. Meter los cortes a un baño de agua a 37°C para extender la muestra.
4. Colocar el corte en el portaobjetos, que ha sido pretatado con silano.
5. E introducir al horno para evaporar residuos de agua y fundir parcialmente la parafina.

C) Ahora se procede a realizar la tinción hematoxilina/eosina:

1. La muestra se desparafina pasándola por diferentes baños de xilol y xilol-etanol.
2. Rehidratar nuevamente la muestra tratándola con etanol al 100%, 96%, 70% y agua.
3. Teñir la muestra hematoxilina de 2-10 minutos, e inmediatamente después se lava con agua y luego con alcohol-ácido (ácido clorhídrico al 1% en etanol al 70%).
4. Virar la hematoxilina con cloruro de litio y se lava con agua.
5. Se tiñe con eosina y se lava con etanol.

D) Finalmente se monta la muestra para poderla observar al microscopio de la siguiente forma:

1. Deshidratar nuevamente, pasando la muestra por diferentes baños con etanol al 70%, 96%, 100%, xilol-etanol y, por último, dos baños de xilol.
2. Adicionar dos gotas de resina sin dejar secar el xilol y se coloca el cubreobjetos.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. 3ª edición. Ed. Interamericana. McGraw Hill. España, 1999, pp. 4-7.
- Ahmed SS, Napoli KL, Strobel HW. Oxygen radical formation during cytochrome P-450-catalized cyclosporine metabolism in rat and human liver microsomes at varying hydrogen ion concentrations. *Moll Cell Biochem*, 1995;151:131-140.
- al Khader A, al Sulaiman M, Kishore PN, et al. Quinacrine attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Transplantation*, 1996;62:427-435.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, et al.. Intake of garlic and its bioactive components. *Am Soc Nutr Sci*, 2001;131:955S-962S.
- Anderson SC, Cockayne S. Química Clínica. Mc.Graw Hill. México, 1995; pp.383.
- Andoh TF, Brdmann EA, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: experimental and clinical observations. *Semin Nephrol*, 1997;17:34-45.
- Augusti KT, Sheela CG. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia*, 1996;52:115-119.
- Baud L, Raymond A. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol*, 1986;251:F765-F776.
- Becker YT, Levenson GE, D'Alessandro AM, et al. Diabetic kidneys can safely expand the donor pool. *Trans*, 2002;74:141-145.
- Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am*, 1985;252:114-119.
- Block E, Cai XJ, Uden PC, et al. *Allium* chemistry: Natural abundance of organoselenium compounds from garlic, onion and related plants and in human garlic breath. *Pure Appl Chem*, 1996;68:937-944.
- Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, et al. Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int*, 1994;46:773-779.
- Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, et al. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthase gene expresión. *Am J Physiol*, 1998;274:F791-F798.
- Bobadilla NA, Tapia E, Jiménez F, et al. Dexamethasone increases eNOS gene expresión and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. *Am Physiol Soc*, 1999;277:F464-F471.
- Bordia T, Mohammed N, Thomson M, et al. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 54:183-186.
- Brenner BM & Rector. The kidney. 6ª edición. WB. Saunders Company, USA. 2000; vol.I, pp.5, 1201-1202.
- Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöker H, et al. Phospholipic-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced aminoacid sequence. *J Biol Chem*, 1994;269:7242-7248.
- Burton GW, Yoyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet*, 1982;2:327-329.
- Campistol JM, Sacks SH. Mechanisms of nephrotoxicity. *Transplantation*, 2000;69:SS5-SS10.
- Clarke H, Ryan MP. Cyclosporine A-induced alterations in magnesium homeostasis in the rat. *Life Sci*, 1999;64:1295-1306.

Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, Characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, 1993;268:2571-2576.

Cohen MS, Bradley E, Britigan D, *et al.* Phagocytes. O₂ reduction, and hydroxyl radical. *Rev Infect Dis*, 1998;10:1088-1096.

Dausch JG, Nixon CW. Garlic: a review of its relationship to malignant disease. *Prev Med*, 1990;19:346-361.

Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, *et al.* Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J*, 1986;235:747-754.

Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, *et al.* Cyclosporine: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral®) in organ transplantation. *Drugs*, 2001;61:1957-2016.

Ferguson CJ, von Ruhland C, Parry-Jones DJ, *et al.* Low-dose cyclosporin nephrotoxicity in the rat. *Nephrol Dial transplant*, 1993;8:1259-1263.

Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, 1978 ;17 :2639-2644.

Franceschini N, Alpers CE, Bennett WM, *et al.* Cyclosporine arteriopathy: effects of drug withdrawal. *Am J Kidney Dis*, 1998;32:247-253.

Frei B, Stocker R, England L, *et al.* Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol*, 1990;264:155-163.

Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. McGraw-Hill. México, 1996;vol.II, pp.1371-1373, 1378.

Guyton AC, Hall J. Tratado de fisiología médica. 9ª edición. Interamericana McGraw-Hill. México, 1997;pp.345-347, 361-364, 369-371.

Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 3ª edición. Oxford University Press. USA. 2001; pp.36-104

Henderson B, Bodmer MW. Therapeutic Modulation of Cytokines. CRC Press, USA, 1996;pp.115.

Hoffman DW, Wiebkin P, Rybak LP. Inhibition of glutathione related enzymes and cytotoxicity of ethacrynic acid and cyclosporine. *Biochem Pharmacol*, 1995;49:411-415.

Horie T, Murayama T, Mishimi T, *et al.* Protection of liver microsomal membranes from lipid peroxidation by garlic extract. *Planta Med*, 1989;55:506-508.

Ide N, Matsuura H, Itakura Y. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res*, 1996;10:340-341.

Ide N, Nelson AB, Lau BH. Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu(2+)-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med*, 1997;63:263-264.

Imai J, Ide N, Nagae S, *et al.* Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med*, 1994;60:417-420.

Inselmann G, Blank M, Baumann K, *et al.* Cyclosporine-A induced lipid peroxidation in microsomes and effect on active and passive glucose transport by brush border membrane vesicles of rat kidney. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol*, 1988;62:207-220.

- Inselmann G, Lawerenz HU, Nellessen U, *et al.* Enhancement of cyclosporin A-induced hepato- and nephrotoxicity by glutathione depletion. *Eur J Clin Invest*, 1994;24:355-359.
- Jung K, Priem F, Klotzek S, *et al.* Methods compared for determining activity of N-acetyl- β -glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzymes*, 1991;45:215-221.
- Jung D, Biggs H, Erickson J, *et al.* New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem*, 1975; 21:1138-1140.
- Kahan BD. Cyclosporine. *New Eng J Med*, 1989;321:1725-1738.
- Kanji VK, Wang C, Salahudeen AK. Vitamin E suppresses cyclosporine A-induced increase in the urinary excretion of arachidonic acid metabolites including F2-isoprostanes in the rat model. *Transplant Proc*, 1999;31:1724-1728.
- Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicol*, 2000;149:43-50.
- Krinsky NI, Deneke SM. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J Natl Cancer Inst*, 1982;69:205-209.
- Krystopik RJ, Bentley FR, Spain DA, *et al.* Lazaroids prevent acute cyclosporine-induced renal vasoconstriction. *Transplantation*, 1997;63:1215-1220.
- Lau BHS, Lam F, Wang-Cheng R. Effect of an odor-modified garlic preparation on blood lipids. *Nutr Res*, 1987;7:139-149.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976;71:952-958.
- López-Ongil S, Saura M, Rodríguez-Puyol D, *et al.* Regulation of endothelial NO synthase expresión by cyclosporine A in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol*, 1996;271:H1072-H1078.
- Maldonado PD. Nefrotoxicidad por Gentamicina. Efecto protector del ajo y su relación con superóxido dismutasa. Tesis Facultad de Química, UNAM, 2000; pp3-4.
- Marchewka Z, Kuźniar J, Długosz A. Enzymatic markers of cyclosporine nephrotoxicity in patients after renal transplantation. *Inter Urol Nephrol*, 1999;31:727-734.
- Mathieson PW. Cyclosporin: nephro-protective as well as nephrotoxic?. *Clin Exp Immunol*, 2000;121:179-180.
- Matsuda S, Koyasu S. Mechanism of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 2000; 47:119-125.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969;244:6049-6055.
- Mihatsch MJ, Ryffel B, Hermle M, *et al.* Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clin Nephrol*, 1986;25:S2-S8.
- Molitoris & Finn. Acute Renal Failure. A companion to Brenner & Rector's. The Kidney. WB Saunders Company. USA, 2001; pp.164
- Netter FH. The Netter collection of medical illustrations. 5ª edición. Editado por Robert K. Shapter & FS Yunkman. Publicado por Novartis Hoeschstetter Printings Co. Pittsburg, PA. 1997.
- Olinescu R, Smith T. Free radicals in medicine. Nova Science Publishers, Inc. USA, 2000; pp.27-30.
- Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Immunosuppressant-induced nephropathy. *Drug Saf*, 1999;21:471-488.
- Parra T, Arriba G, Arribas I, *et al.* Cyclosporine A nephrotoxicity: role of thromboxane and reactive oxygen species. *J Lab Clin Med*, 1998;131:63-70.

Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, *et al.* Effect of the *in vivo* catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med*, 1999;27:245-253.

Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, *et al.* Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med*, 2000;29:602-611.

Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, *et al.* Post-transcriptional control of catalase expresión in garlic-treated rats. *Mol Cell Biochem*, 2001;216:9-19.

Pérez de Lema G, Arribas I, Prieto A, *et al.* Cyclosporin A-induced hydrogen peroxide sintesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life Sci*, 1998;62:1745-1753.

Pesce AJ, Kaplan LA. Métodos de Química Clínica. Ed. Méd. Panamericana, Argentina, 1990; pp. 40-43.

Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Moll Cell Biochem*, 1996;154:55-63.

Rahman K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *Am Soc Nutr Sci*, 2001;131:977S-979S.

Remuzzi G, Perico N. Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int*, 1995;48:S70-S74.

Resch K, Szamel M. Molecular mechanisms of the immunosuppressive action of cyclosporin A. *Int. J. Immunopharmac*, 1997;19:579-585.

Rietz B, Isensee H, Strobach H, *et al.* Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Moll Cell Biochem*, 1993;119:143-150.

Roberfroid M, Calderón PB. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker, Inc. USA, 1995.

Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 4ª edición. Ed. Harcourt Brace. España, 1997; pp. 2.2-2.5.

Rojas O. Inmunología. 1ª edición. Ed. Médica Panamericana. México, 1996; pp.16.

Romano G, Cavarape A, Fvret G, *et al.* Systemic and intratubular effects of cyclosporin-A and tacrolimus on the rat kidney. *Eur J Clin Invest*, 2000;399:215-221.

Roveri A, Cassasco A, Maiorino M, Dalan P, *et al.* Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rats testis. *J Biol Chem*, 1992;126:6142-6146.

Salazar Y. *ALLIUM SATIVUM L.* Un agente antitrombótico diferente. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*, 2000;1:155-160.

Schmid H, Lindmeier I, Schmitt H, *et al.* Nephrotoxicity of cyclosporine A in the rat. *Renal Physiol Biochem*, 1993;16:222-232.

Serino F, Grevel J, Napoli KL, *et al.* Generation of oxygen free radicals during the metabolism of cyclosporine A: a cause-effect relationship with metabolism inhibition. *Moll Cell Biochem*, 1993;122:101-112.

Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J Free Radic Biol Med*, 1985;1:117-124.

Steiner M, Lin RI. Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidant associated with administration of Aged Garlic Extract. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998;31:904-908.

Suetsuna K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum L.* (garlic). *J Nutr Biochem*, 1998;9:415-419.

- Sunde RA. Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr*, 1990;10:451-474.
- Temekonidis TI, Georgiadis AN, Alamanos Y, *et al*. Infliximab treatment in combination with cyclosporin A in patients with severe refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2002;61:822-825.
- Thaci D, Brautigam M, Kaufmann R, *et al*. Body-weight-independent-dosing of Cyclosporine micro-emulsion and three times weekly maintenance regimen in severe Psoriasis. A randomized study. *Dermatol*, 2002;205:383-388.
- Vives JL, Aguilar JL. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 2ª edición. Ed. Masson, España. 1997;pp.76-77.
- Walker PD, Das C, Shah SV. Cyclosporine-A-induced lipid peroxidation in renal cortical mitochondria. *Kidney Int*, 1986;29:311.
- Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, *et al*. Evidence that alterations in renal metabolism and lipid peroxidation may contribute to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*, 1990;50:487-492.
- Wang C, Salahudeen AK. Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: Effects of vitamin E. *Kidney Int*, 1995;47:927-934.
- Weber ND, Andersen DO, North JA, *et al*. *In vivo* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med* 1992;58:417-423.
- Wei Z, Lau BHS. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res*, 1998;18:61-70.
- Weinberg DS, Manier ML, Richardson MD, *et al*. Identification and quantification of organosulfur compliance markers in garlic extract. *J Agric Food Chem*, 1993;41:37-41.
- Weiss S. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand*, 1986;548:9-37.
- Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, *et al*. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta*, 1976a;69:85-91.
- Wellwood JM, Lovell D, Thompson AE, *et al*. Renal damage caused by gentamicin: A study of the effects on renal morphology and urinary enzyme excretion. *J Pathol*, 1976b;118:171-182.
- Whiting PH, Thomson AW, Blair JT, *et al*. Experimental cyclosporin A nephrotoxicity. *Br J Exp Pathol*, 1982;63:88-94.
- Whiting PH, Thomson AW, Blair JT, *et al*. Cyclosporine and renal enzyme excretion. *Clin Nephrol*, 1986;25(suppl 1):S100-S104.
- Wolf A, Clemann N, Friauff W, *et al*. Role of reactive oxygen formation in the cyclosporine A-mediated impairment of renal functions. *Transplant Proc*, 1994a;26:2902-2907.
- Wolf A, Trendelenburg CF, Friauff W, *et al*. Role of glutathione in cyclosporine A *in vitro* hepatotoxicity. *Transplant Proc*, 1994b;26:2912-2914.
- Yoshimura S, Suemizu H, Taniguchi Y, *et al*. The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, séquence and localization to chromosome 5p32. *Gene*, 1994;145:293-297.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 1994;74:139-162.
- Zima T, Kameníková L, Janebová M. The effect of silibinin on experimental cyclosporine nephrotoxicity. *Renal Failure*, 1998 ;20 :471-479.
- Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, *et al*. Cyclosporine A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Physiol*, 1998;275:F595-F604.

Zhong Z, Connor HD, Yin M, *et al.* Dietary glycine and renal denervation prevents cyclosporin A-induced hydroxyl radical production in rat kidney. *Mol Pharmacol*, 1999;56:455-463.