

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

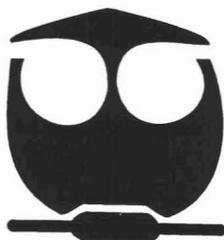
**"PAPEL DEL PEROXINITRITO EN LA
NEFROTOXICIDAD POR CISPLATINA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :
QFB YOLANDA IRASEMA CHIRINO LOPEZ

TUTOR: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2005

m345726



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverrí en el laboratorio 209 del edificio B en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y el proyecto fue apoyado por DGAPA (IN227103 e IX203504). En el periodo 2003-II a 2004-II conté con el apoyo de CONACYT con el registro de becaria 183580.

Agradezco al comité tutorial conformado por el Dr. Gerardo Gamba Ayala del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán" y el Dr. Julio Morán Andrade del Instituto de Fisiología Celular, por su apreciable participación en la revisión de este proyecto.

Agradezco especialmente al Dr. Dolores Javier Sánchez González (Departamento de Biología Celular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea) por su apoyo y valiosa colaboración en el estudio de la óxido nítrico sintasa.

El jurado asignado de examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas) fue el siguiente:

| | |
|------------|----------------------------------|
| PRESIDENTE | Dra. Victoria Chagoya de Sánchez |
| VOCAL | Dr. Ignacio Camacho Arroyo |
| SECRETARIO | Dr. Gerardo Gamba Ayala |
| SUPLENTE | Dr. Rolando E. Hernández Muñoz |
| SUPLENTE | Dr. Armando Tovar Palacio |

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

NOMBRE: Yolanda Jarama Chaverrí

FECHA: 20 junio 2005

FIRMA: [Firma]

CONTENIDO

| | | |
|---------|---|----|
| | RESUMEN | 1 |
| 1. | ANTECEDENTES | 4 |
| 1.1 | Cisplatina | 4 |
| 1.2 | Mecanismo de reacción | 4 |
| 1.3 | Farmacocinética | 5 |
| 1.4 | Efectos secundarios | 5 |
| 2. | Generalidades sobre el riñón | 5 |
| 2.1 | Nefrotoxicidad | 7 |
| 3. | Estrés oxidativo | 8 |
| 3.1 | Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) | 8 |
| 3.2 | Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) | 9 |
| 3.3 | Radical hidroxilo (OH^{\bullet}) | 9 |
| 3.4 | Sistemas antioxidantes | 10 |
| 3.4.1 | Sistema antioxidante enzimático | 10 |
| 3.4.1.1 | Superóxido dismutasa | 10 |
| 3.4.1.2 | Catalasa | 10 |
| 3.4.1.3 | Glutación peroxidasa | 10 |
| 3.4.2 | Sistema antioxidante no enzimático | 11 |
| 3.4.2.1 | El glutatión (GSH) | 11 |
| 3.4.2.2 | El ácido ascórbico | 11 |
| 3.4.2.3 | El α -tocoferol | 12 |
| 3.4.2.4 | Carotenos | 12 |
| 3.4.2.5 | Ácido úrico | 13 |
| 4. | Evidencias del estrés oxidativo en la nefrotoxicidad por cisplatina | 13 |
| 5. | Peroxinitrito | 16 |
| 5.1 | Formación de peroxinitrito | 16 |
| 5.2 | Formación de especies derivadas de nitrógeno | 17 |
| 5.3 | Reactividad del ONOO ⁻ | 18 |
| 5.4 | Óxido nítrico sintasa (NOS) | 19 |
| 5.4.1 | Óxido nítrico sintasa en riñón | 20 |
| 5.5 | Metaloporfirinas que catalizan la descomposición del peroxinitrito | 22 |
| 5.5.1 | FeTPPS | 22 |
| 2. | JUSTIFICACIÓN | 25 |
| 3. | HIPÓTESIS | 26 |
| 4. | OBJETIVOS GENERALES | 27 |
| 4.1 | OBJETIVOS PARTICULARES | 27 |
| 5. | DISEÑO EXPERIMENTAL | 28 |
| 6. | METODOLOGÍA | 30 |
| 6.1 | Reactivos | 30 |
| 6.2 | Animales | 31 |
| 6.3 | Tratamiento de los animales | 31 |
| 6.4 | Determinaciones bioquímicas | 32 |
| 6.4.1 | Evaluación la función tubular | 32 |
| 6.4.1.1 | Proteinuria | 32 |
| 6.4.1.2 | Excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) | 33 |

| | | |
|---------|---|----|
| 6.4.2 | Histología | 34 |
| 6.4.2.1 | Análisis estructural | 34 |
| 6.4.2.2 | Cuantificación del área tubular dañada | 34 |
| 6.4.3 | Evaluación de la función glomerular | 34 |
| 6.4.3.1 | Creatinina en suero | 34 |
| 6.4.3.2 | Nitrógeno de urea en sangre | 36 |
| 6.5 | Estrés oxidativo | 36 |
| 6.5.1 | Cuantificación de grupos carbonilo en corteza renal | 36 |
| 6.5.2 | Cuantificación de MDA en corteza renal | 37 |
| 6.6 | Estrés nitrosativo | 38 |
| 6.6.1 | Análisis de inmunohistoquímica de 3-nitrotirosina | 38 |
| 6.7 | Análisis de inmunohistoquímica de NOS | 39 |
| 6.8 | Hibridación in situ | 39 |
| 6.9 | Actividad de la NOS | 40 |
| 6.10 | Excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ | 41 |
| 6.11 | Análisis estadístico | 42 |
| 7. | RESULTADOS | 43 |
| 7.1 | Peso corporal | 43 |
| 7.2 | Volumen urinario | 43 |
| 7.3 | Evaluación de la función tubular | 44 |
| 7.3.1 | Proteinuria | 44 |
| 7.3.2 | Excreción urinaria de NAG | 44 |
| 7.4 | Histología | 45 |
| 7.4.1 | Análisis histológico | 45 |
| 7.4.1.1 | Cuantificación del área tubular dañada | 46 |
| 7.5 | Evaluación de la función glomerular | 47 |
| 7.5.1 | Creatinina en suero | 47 |
| 7.5.2 | Nitrógeno de urea en sangre | 47 |
| 7.6 | Estrés oxidativo | 48 |
| 7.6.1 | Proteínas oxidadas | 48 |
| 7.6.2 | MDA | 49 |
| 7.7 | Estrés nitrosativo | 49 |
| 7.8 | Expresión de NOS | 49 |
| 7.9 | Cuantificación de NOS | 54 |
| 7.10 | El mRNA de NOS | 57 |
| 7.11 | Cuantificación del mRNA de NOS | 60 |
| 7.12.1 | Actividad de cNOS | 64 |
| 7.12.2 | Actividad de iNOS | 64 |
| 7.13 | Excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ | 65 |
| 8. | DISCUSIÓN | 66 |
| 9. | CONCLUSIONES | 77 |
| 10. | PERSPECTIVAS | 77 |
| 11. | REFERENCIAS | 78 |
| 12. | ANEXO: Artículo publicado | |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| 3-NT | 3-nitrotirosina |
| BUN | Nitrógeno de urea en sangre |
| CAT | Catalasa |
| $\text{CO}_3^{\cdot-}$ | Radical carbonato |
| DMTU | Dimetiltiurea |
| DNPH | Dinitrofenilhidrazina |
| eNOS | Óxido nítrico sintasa endotelial |
| ERN's | Especies reactivas de nitrógeno |
| ERO's | Especies reactivas de oxígeno |
| FeTPPS | 5,10,15,20-tetrakis-4-sulfonatofenil-porfirinato-hierro [III] |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GR | Glutación reductasa |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Glutación oxidado |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrógeno |
| HClO | Ácido hipocloroso |
| HNO_2 | Ácido nitroso |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa inducible |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LOX | Lipooxigenasa |
| MDA | Malondialdehído |
| N_2O_3 | Trióxido de dinitrógeno |
| N_2O_4 | Tetraóxido de dinitrógeno |
| NAG | N-acetil- β -D-glucosaminidasa |
| nNOS | Óxido nítrico sintasa neuronal |
| NO^- | Anión nitroxilo |
| NO^\bullet | Óxido nítrico |
| NO^+ | Catión nitroxilo |
| NO_2^- | Nitratos |
| NO_2^\bullet | Radical dióxido de dinitrógeno |
| NO_2^+ | Catión nitronio |
| NO_3^- | Nitritos |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$ | Anión superóxido |
| ONOO $^-$ | Peroxinitrito |
| ONOOH | Ácido peroxinitroso |
| RONOO | Alquilperoxinitritos |
| SIN-1 | Morfolinosindnomina |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| XO | Xantina oxidasa |

ANTECEDENTES. La cisplatina es un agente antineoplásico ampliamente usado en el tratamiento contra un gran número de tumores sólidos. Sin embargo, uno de sus principales efectos secundarios es la nefrotoxicidad, la cual ha limitado su uso. Hay evidencia experimental que sustenta que los mecanismos de nefrotoxicidad involucran especies reactivas de oxígeno, ya que la administración *in vitro* de quelantes de hierro y antioxidantes como vitamina C y E disminuye los efectos nefrotóxicos así como la lipoperoxidación renal. La administración *in vitro* de atrapadores de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) como tirón (4,5-dihidroxi-1,3-benzeno ácido disulfónico) y radical (OH^{\bullet}) como dimetiltiourea, previenen la apoptosis mientras que la administración de detoxificadores de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como catalasa y piruvato, y atrapadores de $O_2^{\bullet-}$, previenen la necrosis. Por otra parte, hay evidencias de que el óxido nítrico (NO^{\bullet}) participa en el daño renal inducido por cisplatina debido a que la inhibición de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa por aminoguanidina atenúa la nefrotoxicidad por cisplatina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. Los datos anteriores conducen a pensar que el peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), que se sintetiza a partir del $O_2^{\bullet-}$ y de NO^{\bullet} , puede estar aumentado en el riñón de ratas tratadas con cisplatina. El $ONOO^{\bullet}$ no es un radical libre pero es una especie reactiva de nitrógeno muy tóxica. Toda la información anterior conduce a plantear la siguiente pregunta: ¿El $ONOO^{\bullet}$ está aumentado e involucrado en el daño renal inducido por cisplatina?

Para contestar la pregunta anterior se midieron las proteínas nitradas (como una evidencia del aumento del $ONOO^{\bullet}$) y se usó el compuesto 5,10,15,20-tetrakis-[4-sulfonatofenil]-porfirinato-hierro [III] (FeTPPS) el cual es capaz de catalizar la descomposición del $ONOO^{\bullet}$ bajo condiciones fisiológicas. Si el daño renal inducido por cisplatina es atenuado por la administración de FeTPPS, se demostraría la participación del $ONOO^{\bullet}$ en este modelo experimental. De ser así, es importante conocer si la óxido nítrico sintasa contribuye a la formación de $ONOO^{\bullet}$ con un aumento en la síntesis de NO^{\bullet} .

OBJETIVOS. Los objetivos de este trabajo fueron determinar si el $ONOO^{\bullet}$ está involucrado en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina utilizando para ello el FeTPPS por su capacidad para descomponer el $ONOO^{\bullet}$ y de ser así, explorar la posibilidad de que la óxido nítrico sintasa este contribuyendo a la formación de $ONOO^{\bullet}$ por ser la responsable de la síntesis de NO^{\bullet} .

DISEÑO EXPERIMENTAL. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Harlan Teklad, México, D.F.) de 9 a 10 semanas de edad. Se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos: 1) grupo control (CT), al cual se le administró una dosis única de solución salina isotónica estéril vía intraperitoneal (i.p.), que es el vehículo de la cisplatina; 2) grupo cisplatina (Cis), al cual se le administró una dosis única de 7.5 mg/kg de peso de

cisplatina vía i.p.; 3) grupo FeTPPS (Fe), al cual se le administró una dosis de 15 mg/kg de peso cada 24 horas de FeTPPS vía intraperitoneal durante 3 días y 4) grupo cisplatina + FeTPPS (Cis+Fe), al cual se le administró 7.5 mg/kg de peso de cisplatina vía i.p. y 15 mg/kg/día de FeTPPS vía i.p. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas a lo largo del estudio y se sacrificaron al tercer día. Se obtuvo orina, sangre y riñones para medir el daño renal (proteinuria, excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa, creatinina y nitrógeno de urea en sangre y análisis histológico), el estrés oxidativo (proteínas oxidadas y malondialdehído) y nitrosativo (proteínas nitradas). Se evaluó la cantidad de proteína y mRNA de las 3 isoformas de la NOS por inmunohistoquímica y se determinó la actividad enzimática de la NOS así como la excreción urinaria de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$.

RESULTADOS. La cisplatina induce nefrotoxicidad a nivel tubular y glomerular. Mediante marcadores de función tubular, como proteinuria y excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa, se demostró que el FeTPPS confiere protección parcial en el daño inducido por cisplatina. Usando como marcadores glomerulares, creatinina en suero y nitrógeno de urea en sangre, se encontró que el FeTPPS protege parcialmente contra el daño por este nefrotóxico.

El análisis histológico en los animales tratados con cisplatina mostró áreas extensas de vacuolación, edema y necrosis tubular. La porción recta de los túbulos contorneados de la unión cortico-medular presentaron mayor daño celular manifestado por edema y vacuolación celular e intensa inmunotinción para nitrotirosina. La administración de FeTPPS disminuyó en 50% la extensión del daño en los túbulos contorneados proximales, así como la inmunotinción para nitrotirosina, mientras que en la porción recta de los túbulos contorneados la administración de FeTPPS disminuyó 20% del daño así como la intensidad de la inmunotinción para 3-nitrotirosina. La evaluación de malondialdehído, un marcador de lipoperoxidación, aumentó en el grupo con cisplatina y el FeTPPS no fue capaz de prevenirlo. Un análisis cuantitativo de las 3 isoformas de la NOS y de su mRNA mostró un aumento en el grupo administrado con cisplatina pero este no se tradujo en incremento de la producción de NO^* ya que la actividad de NOS no cambia en los diferentes grupos. Además, la excreción urinaria de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ es nula en el grupo administrado con cisplatina.

CONCLUSIONES

- El FeTPPS disminuye la nefrotoxicidad inducida por cisplatina sugiriendo que el ONOO está involucrado en la nefrotoxicidad por cisplatina.
- Los mecanismos de nefrotoxicidad por cisplatina involucran pasos en los que el NO^* no ejerce sus funciones biológicas ya que no es metabolizado de forma normal hasta $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$.

PERSPECTIVAS

- Investigar los mecanismos por medio de los cuales se inactiva la NOS en este modelo experimental.
- Explorar las posibles fuentes de anión superóxido que pudieran contribuir a la síntesis de ONOO^- , entre ellas, la NADPH oxidasa.

1.1 Cisplatina

La molécula de cisplatina fue sintetizada en 1844 por Michele Peyrone en Turín, Italia y fue hasta 1892, en Zurich, Suiza, cuando Alfred Werner determinó su configuración (Werner et al., 1893). La actividad antineoplásica de la cisplatina (Fig. 1) se reportó por primera vez en 1965 en la Universidad de Michigan por Barnett Rosenberg (Rosenberg et al., 1965). Después de un gran número de estudios en modelos tumorales en roedores, perros y monos en abril de 1971 se trató el primer paciente con cisplatina en Texas (Rosenberg, 1985) y en 1976 se detectaron en Nueva York los primeros casos de nefrotoxicidad como efecto secundario (Merrin, 1976) asociado a la administración de cisplatina. Desde entonces, se emplea contra una gran variedad de tumores, entre ellos el de testículo, ovario, pulmón, cabeza, cuello, entre otros con una dosis usual de 20 mg/m²/24 h/5 d o 100 mg/m² cada 4 semanas.

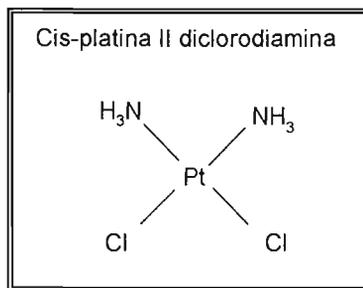


Fig. 1. Estructura química de la cisplatina.

1.2 Mecanismo de acción

La cisplatina entra a las células por difusión y dentro de ella puede reaccionar con grupos tioles. Los cloruros presentes en la cisplatina pueden ser reemplazados por moléculas de agua generando una molécula con carga positiva que es capaz de reaccionar con el nitrógeno de la posición 7 de la guanina en el DNA. También pueden formarse enlaces cruzados entre el platino y guaninas adyacentes y enlaces cruzados

que ocurren con menor frecuencia. La formación de estos enlaces inhibe la transcripción. Algunos estudios han revelado que factores farmacogenéticos y ambientales influyen en la capacidad para mantener estos aductos con el DNA (Chambers y Sande, 1996).

1.3 Farmacocinética

La vida media de la cisplatina es de 25 a 50 minutos tras su administración intravenosa. Más del 90% del fármaco está unido a proteínas plasmáticas. Las concentraciones más altas de fármaco se han reportado en riñón, hígado, intestino y testículos. Durante las primeras 6 horas se excreta una pequeña parte de la cisplatina, después de 24 horas un 25% y en 5 días se puede recuperar el 43% de la dosis administrada (Chambers y Sande, 1996).

1.4 Efectos secundarios

La utilidad de la cisplatina se ha visto comprometida debido a que uno de sus principales efectos secundarios es la nefrotoxicidad, que se presenta entre 25 a 35% de los pacientes incluso a partir de la primera dosis (Davis et al., 2001). Para explicar los mecanismos nefrotóxicos de la cisplatina es necesario conocer algunos aspectos generales del riñón.

2. Generalidades sobre el riñón

El riñón es un órgano bilateral y se localiza debajo del diafragma, en la cavidad abdominal posterior, sus dimensiones en el humano son aproximadamente de 12x6x3 cm. El peso de cada riñón varía de 125 a 170 g en el hombre y de 115 a 155 g en la mujer. Anatómicamente se distinguen dos grandes zonas en un corte transversal, la corteza, que es la parte más externa y la médula, que es la zona más interna (Trisher y Madsen, 2000) (Fig. 2).

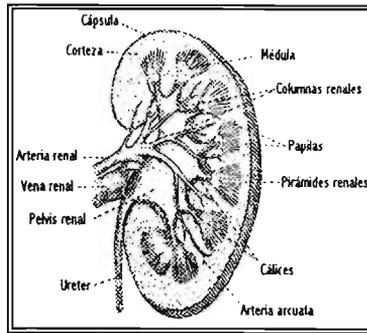


Fig. 2. Principales estructuras anatómicas del riñón (Trisher y Madsen, 2000).

Sus funciones fundamentales son eliminar gran parte de los productos metabólicos terminales del organismo y controlar las concentraciones de la mayor parte de los componentes de los líquidos corporales. La nefrona es la unidad funcional del riñón y está formada por el glomérulo, cápsula de Bowman, túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector (Trisher y Madsen, 2000) (Fig. 3).

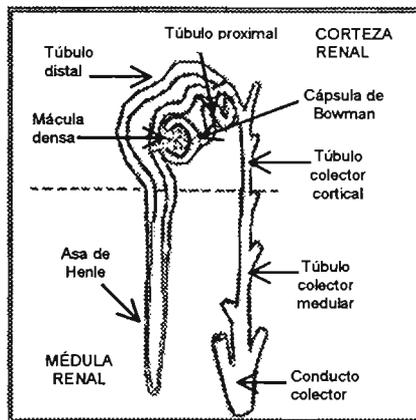


Fig. 3. Anatomía de la nefrona (Trisher y Madsen, 2000).

Las funciones de la nefrona son: a) filtración, b) secreción y c) reabsorción. Los dos riñones, en conjunto, tienen aproximadamente 2 millones de nefronas en humanos y cada una de ellas por separado es capaz de formar orina. La formación de orina inicia

cuando se filtra el líquido de la sangre del glomérulo hacia la cápsula de Bowman y posteriormente a los túbulos, en donde el líquido filtrado se convierte en orina en su camino hacia la pelvis renal.

El glomérulo se localiza en la corteza renal, es una red de hasta 50 capilares paralelos cubiertos por células epiteliales que están incluidas en la cápsula de Bowman donde se lleva a cabo la filtración, la presión de la sangre en el glomérulo hace que se filtre el líquido hacia la cápsula de Bowman, de ahí, pasa al túbulo proximal situado también en la corteza renal. Desde el túbulo proximal, el líquido pasa al asa de Henle, localizada en la médula del riñón, posteriormente entra al túbulo distal, el cual al igual que el túbulo proximal, se encuentra en la corteza renal, y finalmente pasa al túbulo colector que se encarga de reunir el líquido de varias nefronas para luego vaciarse en la pelvis renal.

Cuando el filtrado pasa a través de los túbulos, éstos permiten que gran parte del agua y cantidades variables de soluto se reabsorban; el agua y solutos que no se reabsorben se transforman en orina (Guyton, 1991).

2.1 Nefrotoxicidad

El mecanismo por medio del cual la cisplatina induce nefrotoxicidad involucra cambios a nivel histológico en los túbulos renales que implican alteraciones bioquímicas y fisiológicas e incluyen una disminución en la función mitocondrial, inhibición de las enzimas que participan en la cadena respiratoria que como consecuencia crea un decremento en la producción de ATP. También disminuyen los niveles de glutatión reducido (GSH) y disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). La cisplatina también causa alteraciones en la homeostasis del calcio e induce un incremento en la actividad de la caspasa 3 vía proteína cinasa C (Kuhlman et al., 1997).

Lo anterior demuestra, que el estrés oxidativo está asociado a la nefrotoxicidad inducida por cisplatina. Sin embargo, para profundizar en ello es necesario conocer algunos aspectos del estrés oxidativo.

3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y las defensas antioxidantes (Betteridge, 2000). Este desequilibrio se puede presentar por una producción excesiva de ERO's, por una disminución de las defensas antioxidantes o una combinación de ambas. Por otra parte, las ERO's son moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno y este término incluye a metabolitos de oxígeno que pueden o no ser radicales libres. Las ERO's pueden formarse por la reducción univalente del oxígeno dentro de la célula (Fig. 4) y resultan sumamente tóxicas para la ésta debido a que tienen la capacidad de oxidar un gran número de biomoléculas, entre las que se encuentran el DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos. Entre las principales ERO's se encuentran:

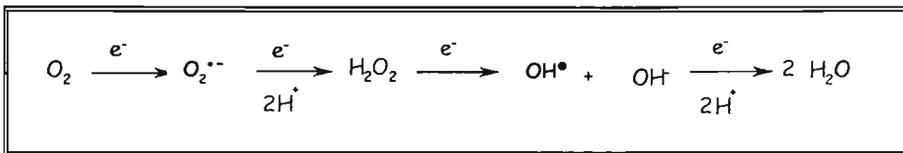


Fig. 4. Reducción univalente del oxígeno.

3.1. Anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$)

El anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) se forma espontáneamente en medios aerobios, por ejemplo, en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria por la adición de un electrón al oxígeno molecular (Fig. 4). También es producido por enzimas como la NADPH oxidasa, xantina oxidasa, óxido nítrico sintetasa (NOS), lipooxigenasa y ciclooxigenasa (Betteridge, 2000; Fridovich, 1999). El $\text{O}_2^{\bullet -}$ tiene la capacidad de reaccionar con los lípidos de las membranas alterando con ello su funcionalidad.

3.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Se forma entre otras vías, por adición de 1 electrón y 2 protones al O₂^{•-}. El H₂O₂ no es un radical libre pero puede atravesar membranas biológicas y por lo tanto difundir a muchos organelos. Una vez que ha difundido, puede dar lugar a la formación de anión hidroxilo y radical hidroxilo vía oxidación de metales de transición en una reacción conocida como reacción de Fenton (Fig. 5).

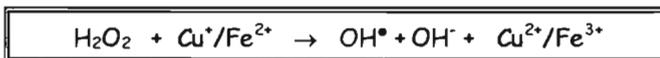


Figura 5. Formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno.

Una fuente importante de formación del H₂O₂ en las células es la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Además, también es el producto enzimático de la superóxido dismutasa. Interviene en la formación de ácido hipocloroso (HClO) por acción de la enzima mieloperoxidasa presente en fagosomas y neutrófilos (Winterbour et al., 2000). Además, el H₂O₂ tiene una importante función como molécula de señalización intracelular (Sundaresen et al., 1995; Patel et al., 2000).

3.3 Radical hidroxilo (OH[•])

El radical hidroxilo es una molécula altamente reactiva capaz de inducir mayor daño en los sistemas biológicos con respecto a otras ERO's (Betteridge, 2000; Halliwell, 1987). Esta especie es producida a partir de una reacción tipo Fenton (Fig. 5) y tiene la capacidad de reaccionar con biomoléculas como el DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos (Olinescu et al., 2002), lo que causa disfunción celular. Los mecanismos de defensa antioxidantes que detoxifican a la célula de ERO's de forma normal pueden clasificarse como enzimáticas y no enzimáticas.

3.4 Sistemas antioxidantes

3.4.1 Sistema antioxidante enzimático

3.4.1.1 La superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) pertenece a una familia de metaloenzimas que catalizan la conversión del $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 y a oxígeno molecular (Fig. 6):

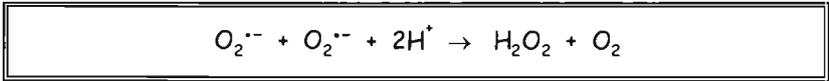


Fig. 6. Reacción catalizada por SOD.

3.4.1.2 La catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) es una hemoproteína tetramérica con peso molecular de 240 kDa, con cuatro ferriprotoporfirinas por tetrámero (Aebi, 1982). Cataliza la formación de agua y oxígeno a partir de H_2O_2 (Fig. 7).

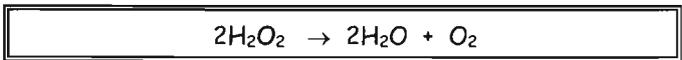


Fig. 7. Reacción catalizada por CAT.

3.4.1.3 La GPx (EC 1.11.1.9) cataliza la descomposición del H_2O_2 o de otros peróxidos orgánicos a H_2O (Fig. 8) utilizando glutatión reducido (GSH), que se transforma en glutatión oxidado (GSSG) (reacción A). El GSSG a su vez es reducido a GSH por la GR en presencia de NADPH formando un ciclo redox, impidiendo que se agoten las reservas de GSH (reacción B) (Harris, 1992; Ichikawa et al., 1994). El NADPH es regenerado por la acción de las enzimas málica y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

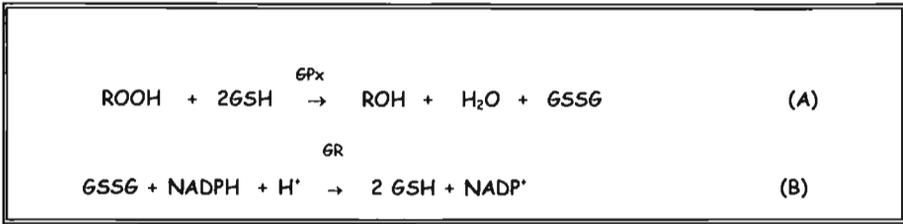


Fig. 8. Reacciones catalizadas por GPx.

3.5 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Dentro de esta clasificación se agrupan un gran número de moléculas que pueden tener una o más características como la capacidad de reducir compuestos oxidados u otros antioxidantes, prevenir la lipoperoxidación o participar como cofactor de reacciones enzimáticas antioxidantes.

3.5.1 El GSH (Fig. 9) es un tripéptido compuesto por cisteína, glicina y glutamato (Meister y Tate, 1976). Este se sintetiza en 2 pasos por la glutamato cisteína ligasa (EC 6.3.2.2) y la glutatión sintetasa (EC 6.3.2.3), consumiendo 1 molécula de ATP en cada paso (Dalton et al., 2004), además de ser obtenido mediante la dieta.

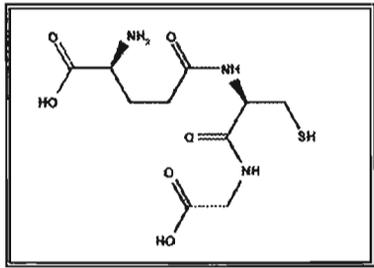


Fig. 9. Estructura química del glutatión.

3.5.2 El ácido ascórbico (Fig. 10) es una vitamina hidrosoluble que no es posible sintetizar endógenamente en el humano por lo que debe de adquirirse a través de la dieta. El ácido ascórbico ejerce sus propiedades antioxidantes atrapando ERO's como el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y evitando la oxidación de diversas biomoléculas como proteínas y lípidos. Otra

singlete de oxígeno además de ejercer efectos anticancerígenos debido a su capacidad para interactuar con otros radicales (Krinsky, 1989).

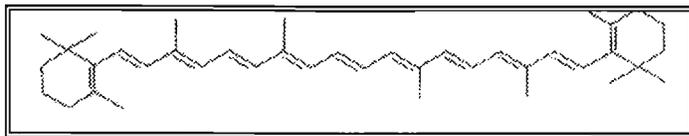


Fig. 12. Estructura química del β -caroteno, miembro de la familia de los carotenoides.

3.4.2.5 El ácido úrico (Fig. 13) es el producto final del catabolismo de purinas en el humano y es excretado a través de los riñones (Reyes, 2003). Sin embargo, es considerado como un antioxidante hidrosoluble debido a su capacidad para atrapar algunas ERO's, entre las que se encuentran singlete de oxígeno. Otra de las propiedades antioxidantes que posee el ácido urico consiste en ser una molécula blanco del H_2O_2 en presencia de metahemoglobina (Ames et al., 1981). Otros experimentos demostraron que el ácido úrico es capaz de atrapar OH^\bullet generado por H_2O_2 en presencia de $FeSO_4$ o de luz UV (Howell y Wyngaarden, 1960).

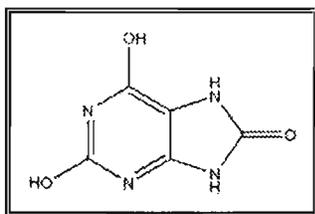


Fig. 13. Estructura química del ácido úrico.

4. Evidencias del estrés oxidativo en la nefrotoxicidad por cisplatina

Existen un gran número de evidencias que sustentan la participación del estrés oxidativo en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina. Entre ellas se encuentra la disminución del 29% en los niveles renales de GSH en ratas de la cepa Wistar a las 24 horas de ser tratadas con una dosis de 5 mg/Kg de cisplatina así como un incremento

del 29% en lipoperoxidación medido como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Silva et al., 2001).

Por otra parte, en estudios con cisplatina a una dosis de 7.5 mg/kg en ratas de la cepa Swiss se encontró una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes como GPx y CAT así como una disminución en los niveles de GSH y aumento en la lipoperoxidación medida como incremento en los niveles de malondialdehído (MDA) (Mansour et al., 2002).

Estudios *in vivo* han demostrado que la cisplatina induce nefrotoxicidad a una dosis de 10 mg/kg/ip en ratas macho de la cepa Wistar. En dicho estudio se compararon los efectos de la deferoxamina (250 mg/kg/ip), vitamina C (100 mg/kg/ip) y vitamina E (100 mg/kg/ip) sobre la lipoperoxidación y la actividad enzimática de CAT, SOD y GR. Las enzimas antes mencionadas disminuyeron 3 días después de la administración de la cisplatina, mientras que los niveles de MDA, un marcador de lipoperoxidación, y de H₂O₂, aumentaron en el grupo administrado con cisplatina. Los 3 antioxidantes previnieron la disminución de la actividad de SOD, pero no la de CAT y GR. De la misma manera, los 3 antioxidantes previnieron el aumento de los niveles de MDA y H₂O₂ (Bolaman et al., 2004).

Otros estudios *in vivo* han demostrado (Ozen et al., 2004) que la cisplatina induce un aumento en los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN), reduce la actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx e induce un aumento de MDA y la actividad de mieloperoxidasa. También se encontró un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO•) en riñón. El ácido cafeico mostró protección en este modelo al evitar la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes y el incremento de BUN y de NO• en riñón. La cisplatina induce vacualización celular, hinchamiento, descamación y necrosis en células tubulares y la administración del ácido cafeico tuvo un efecto protector al reducir histológicamente el daño tubular. Los efectos observados por la administración de cisplatina están asociados a especies reactivas de oxígeno, por lo que el efecto protector del ácido cafeico puede deberse a su capacidad para atrapar radicales libres.

En un modelo *in vivo* por 5 días se demostró que la cisplatina induce nefrotoxicidad utilizando una dosis única de 6 mg/kg/ip y se observó que aumentaron los niveles de urea y creatinina, que disminuyó la actividad enzimática de SOD y CAT, y que aumentaron los niveles de MDA. Estos efectos se previnieron con la administración de ácido acetilsalicílico a una dosis de 2.5 mg/kg/ip (Ulubas et al., 2003), un compuesto que ha demostrado atrapar radicales libres (Wu et al., 2004).

La administración de cisplatina (6 mg/Kg/ip) a ratas macho de la cepa Wistar indujo un aumento en los niveles de MDA y una disminución en los niveles de GPx, GSH, vitamina E, y β -caroteno. La administración de selenio y vitamina E lograron prevenir el aumento en los niveles de MDA y la disminución de los niveles de GSH, vitamina E y β -caroteno (Naziroglu et al., 2004).

Estudios *in vitro* han demostrado que una concentración de cisplatina de 2 mM induce necrosis en cultivos primarios de células del túbulo proximal de conejo mientras que una concentración de 50 μ M induce apoptosis. La necrosis se previene por la administración de tirón, un compuesto capaz de atrapar $O_2^{\bullet-}$, así como por la administración de catalasa y piruvato, ambos detoxificadores de H_2O_2 . La dimetiltiourea (DMTU) y la tiourea, atrapadores de radical hidroxilo, no tuvieron efecto en la necrosis inducida por cisplatina. La apoptosis se previene parcialmente por la administración de tirón y DMTU pero no por la de antioxidantes y detoxificadores de H_2O_2 (Baek et al., 2003).

La administración de una dosis única de cisplatina de 8 mg/kg de peso vía intravenosa a ratas macho de la cepa Sprague-Dawley por 5 días induce un aumento en la concentración de creatinina en suero y BUN así como alteraciones morfológicas que incluyen necrosis en los segmentos S1, S2 y S3 de los túbulos proximales. La administración de DMTU a una dosis de 500 mg/kg de peso vía intraperitoneal una hora antes de la administración de cisplatina y posteriormente cada 12 horas durante 5 días, previene las alteraciones mencionadas (Tsuruya et al., 2003).

Los resultados anteriores muestran evidencia de la participación del estrés oxidativo en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina, sin embargo, no hay evidencia de

la participación de especies reactivas de nitrógeno como el ONOO^- , que es una de las más importantes debido a su reactividad.

5. Peroxinitrito

5.1 Formación del peroxinitrito

El ONOO^- es una especie formada por la reacción entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el NO^\bullet . El $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede ser producido por enzimas como la NADPH oxidasa, NOS, xantina oxidasa (XO), lipooxigenasa (LOX), P450 oxidasa y citocromo b5 y por vías no enzimáticas en diversos sitios celulares debido a la reducción incompleta del oxígeno molecular cuando se adiciona 1 electrón. Por otra parte, el NO^\bullet es sintetizado por la NOS a partir de L-arginina, O_2 y NADPH. Existen dos isómeros del ONOO^- , la forma cis y la forma trans, siendo esta última forma menos estable que la forma cis y por lo tanto más reactiva (Liang y Andrews, 2001) (Fig. 14).

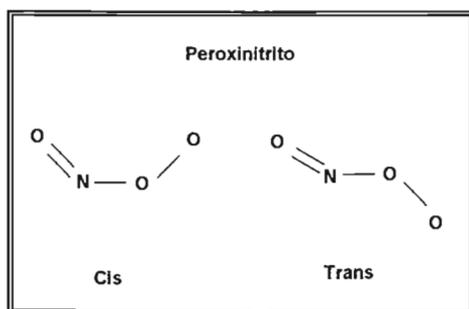


Fig. 14. Isómeros cis y trans del ONOO^- .

El ONOO^- puede difundir a través de las bicapas de fosfolípidos a una velocidad de 8×10^{-4} cm/s (Marla et al., 1997) lo cual le da la capacidad de reaccionar con un gran número de moléculas como lípidos y proteínas.

5.2 Formación de especies derivadas de nitrógeno

Además el ONOO^- puede protonarse bajo condiciones fisiológicas para formar el ácido peroxinitroso (ONOOH) y éste a su vez puede descomponerse en radical hidroxilo y radical dióxido de nitrógeno. Estas moléculas químicamente derivadas del nitrógeno se conocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN's) (Radi et al., 2001).

Entre las ERN's se encuentran los radicales NO^\bullet y dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y los no radicales como el ácido nitroso (HNO_2), catión nitronio (NO_2^+), catión nitroxilo (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), ONOOH y alquilperoxinitritos (RONOO) y ONOO^- (Matterlini et al., 2002).

Por otra parte, el ONOO^- en presencia de dióxido de carbono (CO_2) da lugar a la formación del anión nitrosoperoxicarboxilato el cual puede isomerizarse en un 65-70% a CO_2 y NO_3^- y un 30-35% a NO_2^\bullet y radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet -}$) (Pietraforte et al., 2003).

En la tabla 1 se presentan una serie de reacciones que involucran la formación de especies reactivas de nitrógeno:

| Tabla 1. Formación de especies reactivas de nitrógeno. | |
|--|---|
| $\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-} \xrightarrow{\text{H}^+} \text{ONOO}^- \rightarrow \text{HONOO}$ | Formación de ONOO^- a partir de NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$. |
| $\text{HONOO} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{NO}_2^\bullet$ | El radical hidróxilo es capaz de modificar bases del DNA. El radical dióxido de nitrógeno es un poderoso agente nitrante y promueve procesos de lipoperoxidación. |
| $2\text{NO}_2^\bullet \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4 \leftarrow \text{NO}^\bullet + \text{OONO}^\bullet \leftarrow \text{NO}^\bullet + \text{O}_2^\bullet$ | Mediante diferentes reacciones puede generarse tetraóxido de dinitrógeno, un poderoso agente nitrante. |
| $\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$ | Los metabolitos finales del NO^\bullet son los aniones nitrito y nitrato. |
| $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^\bullet$ | A su vez, el nitrito en presencia de H_2O_2 puede generar radical dióxido de nitrógeno. |
| $\text{NO}_2^\bullet + \text{NO}^\bullet \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$ | El dióxido de dinitrógeno puede generar trióxido de dinitrógeno, un agente capaz de desaminar guanina, citosina y adenina convirtiéndolas a xantina, uracilo e hipoxantina respectivamente. |
| $\text{NO}_2^- + \text{HOCl} \rightarrow \text{NO}_2\text{Cl}$ | El cloruro de nitrilo es un agente nitrante que se forma por reacción entre nitrito y ácido hipocloroso; este último proveniente de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa. |
| $\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CO}_3^{\bullet-} + \text{NO}_2^\bullet$ | El radical carbonato oxida aminoácidos aromáticos. |

5.3 Reactividad del ONOO^-

El ONOO^- es una especie muy oxidante que puede reaccionar con un amplio número de moléculas entre las que se encuentran bases nitrogenadas como la guanina que es modificada a 8-nitroguanina (Szabo, 1997). El ONOO^- también reacciona con algunos aminoácidos como la tirosina dando lugar a la formación de 3-nitrotirosina (3-NT),

además de reaccionar con otros aminoácidos como triptófano, cisteína y metionina. Estos aminoácidos al sufrir alteraciones pueden llevar a la pérdida de la función de la proteína en la que se encuentren.

Se sabe que proteínas como la actina del citoesqueleto, tirosina hidroxilasa y prostaciclina sintasa entre otras, son blanco del ONOO^- y pierden su actividad biológica. También inactiva enzimas como la SOD, la aconitasa, una enzima del ciclo de Krebs, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, una enzima de la vía glucolítica, y otras como la creatinina cinasa. Puede oxidar moléculas de interés biológico como la tetrahidrobiopterina, un cofactor de la NOS y la tiroxina hidroxilasa y el GSH, que también es cofactor de enzimas como la glutatión peroxidasa (Szabo, 2003).

5.4 Óxido nítrico sintasa (NOS)

La NOS es una enzima con 3 isoformas producto de 3 distintos genes. La tipo I o neuronal (nNOS) y tipo III o endotelial (eNOS) son constitutivas y reguladas por concentraciones intracelulares de calcio. La tipo II o inducible (iNOS) es independiente de calcio y regulada transcripcionalmente por citocinas como interferón γ o productos bacterianos como lipopolisacárido. Todas son homodímeros con un dominio reductasa en el extremo carboxilo terminal donde se localiza un sitio de unión a FMN, FAD y NADPH y un dominio oxigenasa en el extremo amino terminal donde se localiza un grupo hemo, un sitio de unión a tetrahidrobiopterina y uno a L-arginina (Bredt, 1999). Los electrones donados por el NADPH, FMN y FAD, fluyen del dominio reductasa al oxigenasa para la síntesis de NO^* (Kone, 2004). Estas enzimas catalizan la oxidación de 5 electrones de la L-arginina consumiendo 2 moles de O_2 y 1.5 moles de NADPH por cada mol de NO^* formado (Fig. 15) (Zhang et al., 2003).

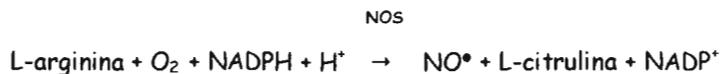


Fig. 15. Reacción catalizada por la NOS para la síntesis de NO[•].

El NO[•] es una molécula pequeña de gas hidrofóbico con un tiempo de vida corto pero con un alto coeficiente de difusión de tal forma que los efectos directos del NO[•] ocurren cerca del lugar donde se produce. El NO[•] induce la activación de guanilato ciclasa soluble la cual es una hemoproteína que se encuentra en citosol. Estas últimas producen un incremento en los niveles intracelulares de GMPc activando a una proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) (Kone, 2004).

5.4.1 Óxido nítrico sintasa en riñón

La nNOS, una proteína de 1439 aminoácidos (Hall et al., 1994) se localiza en macula densa, túbulos colectores y pelvis renal (Kone, 2004). La expresión de esta isoforma es regulada por factores de transcripción como AP-2 y NF-κB. La nNOS también es regulada postranscripcionalmente mediante fosforilaciones por la proteína cinasa A, C o G, las cuales reducen la actividad catalítica de esta isoforma, mientras que la desfosforilación por calcineurina incrementa su actividad. Por otra parte, una proteína de choque térmico, la Hsp 90, se asocia con esta isoforma para formar un complejo que promueve la síntesis de NO[•] (Bender et al., 1999).

La iNOS tiene 1153 aminoácidos y se localiza en túbulos proximales y distales (Kone BC, 2004). Esta isoforma se induce bajo diversas condiciones de estrés dentro de las que se incluyen aumento de interleucina-1β en células mesangiales (Kunz et al., 1996), condiciones de isquemia renal aguda (Komurai et al., 2003) y lipopolisacárido (Liaudet et al., 1997; Lee et al., 2002) entre otras. Además esta isoforma es regulada positivamente por niveles de AMP cíclico (Eberhardt et al., 1996).

La eNOS conformada por 1203 aminoácidos se localiza en la arteriola aferente y eferente del glomérulo, en los túbulos proximales, distales y colectores así como en las células endoteliales vasculares (Kone, 2004). La Hsp 90, una proteína de choque térmico, facilita la unión de calcio-calmodulina y dicha interacción es requerida para que los electrones fluyan hacia el dominio reductasa. Además, la vida media del mRNA de la eNOS se prolonga bajo condiciones de estrés oxidativo (Drummond et al., 2000).

Existen evidencias que sustentan la participación de la NOS en procesos fisiopatológicos en diversos modelos. Por ejemplo, se ha encontrado que la administración de L-arginina incrementa la producción de ROS en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina (Sato et al., 2005). El bloqueo de la NOS mediante la administración de N(G)-nitro-L-arginina metil ester, un análogo de la L-arginina que se emplea comúnmente como inhibidor de la NOS, reduce parcialmente la generación de ROS (Sato et al., 2005). Sin embargo este comportamiento no es absoluto, debido a que la suplementación de L-arginina en un modelo de insuficiencia renal inducida por gentamicina tiene un efecto protector (Secilmis et al., 2005).

También existen cambios en el patrón de expresión y actividad de la NOS bajo condiciones fisiopatológicas. Un ejemplo de ello se muestra en ratas Wistar Kyoto espontáneamente hipertensas en las que se observa un incremento en la expresión de iNOS en corteza renal de 96% y un aumento de 2 veces en su actividad con respecto a ratas normotensas. Específicamente en túbulos proximales hubo un incremento en la expresión de 104% y de 3.3 veces en la actividad acompañada de un aumento de 2 veces en los niveles de nitritos (Kumar et al., 2005). Otro ejemplo del cambio en el patrón de expresión de la NOS en el riñón se observó en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas, en el que la expresión de la eNOS aumentó 1.9 veces debido al angiotensinógeno II. Además esta alteración esta acompañada de un aumento de $O_2^{\bullet-}$ producido por la NADPH oxidasa, la cual presentó un aumento en la expresión de una de sus subunidades, la gp91phox así como disminución de la SOD-3 o también conocida como la isoforma extracelular (Adler, 2003).

Existe la posibilidad de que en ciertas patologías, el papel tóxico del NO^\bullet se deba a que al reaccionar con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ se genere ONOO^- . Este último debido a sus características, podría ser responsable, al menos en parte de los efectos observados en algunas patologías. Una estrategia para conocer la participación del ONOO^- en diversos modelos, es el uso de compuestos que atrapen específicamente a esta especie.

5.5 Metaloporfirinas que catalizan la descomposición del peroxinitrito

Existen complejos hidrosolubles de hierro III que catalizan la descomposición de ONOO^- como el 5,10,15,20-tetrakis (2',4',6'-trimetil-3,5-disulfonatofenil) porfirinato de hierro [VII], $\text{Fe}(\text{TMPS})$; 5,10,15,20-tetrakis (N-metil-4'-piridil) porfirinato de hierro [V], $\text{Fe}(\text{TMPyP})$ y 5,10,15,20-tetrakis-4-sulfonatofenil-porfirinato-hierro [III], (FeTPPS). Estas metaloporfirinas catalizan la conversión del ONOO^- a nitratos (Misko et al., 1998) bajo condiciones fisiológicas, pH 7.4 y 37°C (Jensen y Riley, 2002). En el centro de su estructura presentan un núcleo de hierro responsable de la catálisis del ONOO^- a NO_3^- . Estos complejos resultan de interés farmacológico en modelos de enfermedad que involucren al ONOO^- .

5.5.1 FeTPPS

El papel protector de estas metaloporfirinas, entre ellas el FeTPPS , ha mostrado un papel importante en diversos modelos. Uno de ellos en corazón de ratas de la cepa Wistar con hiperlipidemia, donde se encontró que esta patología favorece el incremento en los niveles de ONOO^- así como el aumento en la presión diastólica ventricular izquierda. La administración de FeTPPS (Fig. 16), el cual es capaz de catalizar la descomposición del ONOO^- , previene el aumento en la presión en ratas sometidas a una dieta enriquecida con colesterol al 2% (Onody et al., 2003).

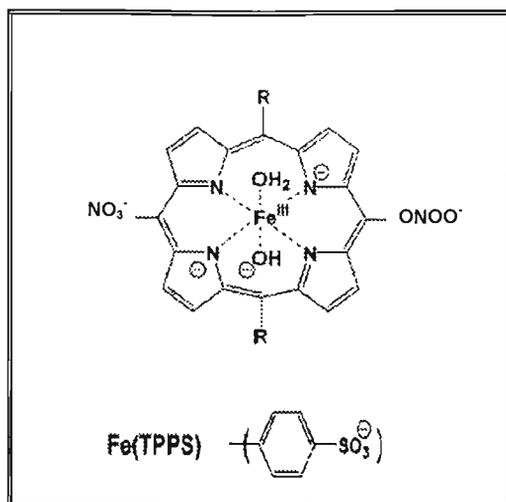


Fig. 16. Estructura química de FeTPPS.

El FeTPPS es capaz de catalizar la descomposición de ONOO^- a nitratos (NO_3^-) bajo condiciones con relevancia fisiológica, pH 7.4 a 37°C . Un electrón cataliza la oxidación del átomo central de hierro (Fe) de la porfirina pasando del estado Fe (III) a un intermediario y posteriormente al estado Fe (IV) generando anión nitrito (NO_2^-), el que a su vez puede volver a reaccionar con la porfirina en estado reducido (Fe III) generando NO_3^- . La adición de moléculas como ascorbato (AH_2) incrementa la velocidad de descomposición de ONOO^- .

En experimentos con morfolinisindnmina (SIN-1), un compuesto que genera ONOO^- al liberar NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$ se encontró daño en cultivos de células corticales. En estos cultivos la exposición a SIN-1 induce daño concentración-dependiente e inmunoreactividad para 3-NT, un marcador de estrés nitrosativo. Sin embargo, la exposición a donadores, únicamente de NO^\bullet , no resulta en el aumento de 3-NT. La incubación con FeTPPS o con atrapadores de NO^\bullet previno la citotoxicidad y la formación de 3-NT (Trackey et al., 2001). Esto indica que el ONOO^- es responsable de la nitración de proteínas, además de que el aumento de 3-NT esta asociado al daño en estos cultivos.

Por otra parte, se ha demostrado en corazones aislados de ratas que la perfusión por 120 minutos con citocinas proinflamatorias como la IL-1, interferón- γ y TNF- α son responsables del decremento en la función contráctil del miocardio. Aunque el mecanismo de daño no está claro, se sabe que hay un aumento en la expresión de iNOS. Además se ha demostrado en este modelo, que la actividad de enzimas como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa están incrementadas, por lo que los niveles de $O_2^{\bullet-}$. En consecuencia también están elevados y al reaccionar con el NO^{\bullet} se genera el $ONOO^-$, lo cual se comprobó usando marcadores de estrés nitrosativo que detectaron la presencia de nitrotirosina y ditirosina. La administración de FeTPPS en este modelo, previno la disminución de la función del miocardio (Ferdinandy et al., 2000).

Por otra parte, la administración de metanfetamina (Imam et al., 2000), un neurotóxico que causa daño en las terminales nerviosas dopaminérgicas en roedores, primates y humanos (Imam et al., 2002), induce estrés oxidativo y en conjunto con el aumento de la actividad de la nNOS, se favorece la formación de $ONOO^-$. El tratamiento con FeTPPS disminuye los niveles de $ONOO^-$ inducido por metanfetamina en este modelo (Imam et al., 2000).

En un modelo in vitro en la enfermedad de Alzheimer en el que se induce neurotoxicidad mediante lipopolisacárido o el péptido β -amiloide, el FeTPPS descompone el $ONOO^-$ y evita los efectos neurotóxicos de estos 2 tratamientos (Xie et al., 2002).

Lo anterior muestra al FeTPPS como una herramienta útil no sólo para conocer si el $ONOO^-$ participa en diversas fisiopatologías, sino también como un posible agente terapéutico capaz de disminuir los efectos tóxicos debidos al mismo.

2. JUSTIFICACIÓN

La cisplatina es un agente antineoplásico ampliamente usado en el tratamiento contra el cáncer de un gran número de tejidos. Sin embargo, uno de sus principales efectos secundarios es la nefrotoxicidad. Existen evidencias de que uno de los mecanismos implicados en la nefrotoxicidad causada por cisplatina en ratas es el estrés oxidativo. Sin embargo, no se ha demostrado que especies reactivas de nitrógeno, como el ONOO^- , estén involucradas en los mecanismos de nefrotoxicidad inducida por cisplatina. Por otra parte, el FeTPPS es un compuesto que ha demostrado en varios modelos experimentales, ser capaz de descomponer el ONOO^- .

Lo anterior justifica la búsqueda de compuestos que puedan disminuir el efecto colateral de la cisplatina así como el estudio de FeTPPS por ser un compuesto con capacidad para catalizar la descomposición del ONOO^- .

Además, la formación de ONOO^- involucra la participación del NO^* , el cual es producido por la NOS. Sin embargo, en este modelo no se conoce si esta enzima contribuye en la formación de ONOO^- aumentando la producción de NO^* . Esto justifica el estudio de la expresión y actividad de la NOS.

3. HIPÓTESIS

Existen evidencias de que el estrés oxidativo está involucrado en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina. Posiblemente otra de las especies involucradas sea el ONOO^- y un tratamiento con FeTPPS podría disminuir la nefrotoxicidad tras la administración de cisplatina debido a su capacidad para catalizar la descomposición del ONOO^- .

Si en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina el ONOO^- contribuye al daño de forma importante y dado que su formación involucra el NO^* , la expresión de la NOS podría estar incrementada así como su actividad, explicando en parte, el aumento del ONOO^- .

4. OBJETIVOS GENERALES

- ☐ Determinar si el ONOO^- está involucrado en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina evaluando el efecto del FeTPPS.
- ☐ Evaluar la participación de la NOS en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina mediante su expresión, mRNA, actividad y productos del metabolismo.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto del FeTPPS por medio de la evaluación de los siguientes parámetros:

- ☐ Función tubular.
- ☐ Daño histológico.
- ☐ Función glomerular.
- ☐ Estrés oxidativo.
- ☐ Estrés nitrosativo.

Si el ONOO^- se encuentra involucrado en la nefrotoxicidad por cisplatina se evaluará la contribución de las 3 isoformas de la NOS en corteza renal externa e interna mediante:

- ☐ Inmunolocalización de la proteína y mRNA así como su cuantificación.
- ☐ Actividad de las isoformas constitutivas y de la isoforma inducible.
- ☐ La excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

- ▣ Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Harlan Teklad, México, D.F.) de 9 a 10 semanas de edad (250 g aproximadamente). Se agruparon aleatoriamente en 4 grupos: 1) Grupo Control (CT), al cual se le administra una dosis única de solución salina isotónica estéril vía intraperitoneal, que es el vehículo de la cisplatina; 2) Grupo Cisplatina (Cis), al cual se le administra una dosis única de 7.5 mg/kg de peso de cisplatina vía intraperitoneal (Al-Majed et al., 2003); 3) Grupo FeTPPS (Fe), al cual se le administra una dosis de 15 mg/kg de peso cada 24 horas de FeTPPS vía intraperitoneal (Onody et al., 2003) y 4) Grupo Cisplatina + FeTPPS (Cis+Fe), al cual se le administró 7.5 mg/kg de peso de cisplatina vía intraperitoneal y 15 mg/kg de peso de FeTPPS vía intraperitoneal.
- ▣ La función tubular se evaluó realizando las siguientes determinaciones: proteinuria y excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG).
- ▣ La evaluación del daño histológico se realizó por medio de un análisis cuantitativo de área tubular dañada empleando una tinción con hematoxilina y eosina.
- ▣ La función glomerular se evaluó realizando las siguientes determinaciones: creatinina en suero y BUN.
- ▣ El estrés oxidativo se evaluó midiendo proteínas oxidadas y malondialdeído por espectrofotometría.
- ▣ El estrés nitrosativo se evaluó mediante la detección inmunológica de 3-nitrotirosina por inmunohistoquímica.
- ▣ Las 3 isoformas y el mRNA de la NOS se evaluaron mediante detección inmunológica e hibridación in situ respectivamente. Posteriormente se hizo un análisis cuantitativo del área tubular marcada.

- ▣ Se evaluó la actividad de la nNOS y eNOS, isoformas constitutivas de la NOS y de la isoforma inducible, iNOS en corteza renal.
- ▣ Se determinó la excreción urinaria $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, productos finales del metabolismo del NO^* .

6. METODOLOGÍA

6.1 Reactivos

La cisplatina (no. de catálogo P-4394), la resina de intercambio catiónico Dowex-50WX8-200 fueron adquiridas en Sigma-Aldrich el FeTPPS de Calbiochem (no. de catálogo 341492) el anticuerpo anti 3-nitro-L tirosina (No. de catálogo 05-233) fue obtenido en Upstate (Lake Placid, NY, USA), el anticuerpo anti Ig acoplado a peroxidasa de rábano fue de Stressgen (Victoria BC, Canada). Los anticuerpos anti-nNOS (no de catálogo sc-5302), anti-iNOS (no de catálogo sc-7271), anti-eNOS (no de catálogo sc-654) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnolog. El bromolevamisol, anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina y el rojo rápido (no. de catálogo K1396) y la 3,3 diaminobencidina (no. de catálogo K346811) fueron de estuches comerciales de DakoCytomation. Las sondas de oligonucleótidos para las 3 isoformas de la NOS con un fluorocromo en el extremo 5 de MWG Biotech, Ebersberg, Alemania'. El p-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminido, p-nitrofenol, albúmina sérica bovina (ASB), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), glutatión reductasa, GSH, leupeptina, pepstatina A, aprotinina, dinitrofenilhidrazina (DNPH), sulfato de estreptomina, guanidina-HCl, L-arginina (no. de catálogo A-5131), tetrahidrobiopterina (no. de catálogo T-4425), el β -mercaptoetanol (no. de catálogo M-3148), nitro-L-arginina metil ester-HCl, naftaleno (no. de catálogo 7021), calmodulina, reactivo de Folin & Ciocalteu's fenol, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, hidroxitolueno butilado, tritón, Tris-HCl, Hepes (no. catálogo H-3375), dietilpircarbonato (DEPC) (no. catálogo D-5758), N-naftiletildiamina (no. de catálogo N-9125), 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil) benzeno (POPOP) y 2,5-Difeniloxazol (POP) fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La [3H]-L-arginina fue de Amersham. El 1-metil-2-fenilindol, etilenglicol y dioxano se obtuvieron de Aldrich (St. Louis, MO). El citrato trisódico, la azida de sodio y el cloruro de calcio fueron obtenidos en Merck. El carbonato de sodio, ácido tricloroacético (TCA), EDTA disódico, fosfato básico y dibásico de sodio, HCl, sulfato de amonio, sulfato de cobre,

hidróxido de sodio, el cloruro cúprico, alcohol etílico absoluto anhidro, xilenos, acetonitrilo, ácido sulfanílico y nitrito de sodio fueron obtenidos en J.T. Baker (México, D.F.). Las determinaciones de urea en sangre se realizaron con estuches comerciales (no. de catálogo 1001325) de la marca Spinreact, S.A., (España). Para las determinaciones de creatinina en suero y orina se utilizó hidróxido de sodio de Beckman (no. de catálogo T002241) y ácido pícrico (no. de catálogo SA080) de Analit. La parafina (no. de catálogo 8889-501006) se obtuvo de Oxford. La hematoxilina (no. de catálogo 688), la eosina (no. de catálogo 738) y la resina sintética (no. de catálogo 7987) fueron obtenidas de Hycel de México SA de CV.

6.2 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Harlan Teklad, México, D.F.) de 250 g de peso (9-10 semanas de edad). Las ratas se aclimataron a jaulas metabólicas de acero inoxidable dos días antes del estudio y así se mantuvieron a lo largo del tratamiento con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 h con agua *ad libitum*.

6.3 Tratamiento de los animales

Se usaron 24 ratas las cuales se dividieron en los siguientes grupos: 1) Grupo Control (CT, n=6), al cual se le administró una dosis única de 1.4 mL de solución salina isotónica estéril vía intraperitoneal (i.p), que es el vehículo de la cisplatina; 2) grupo cisplatina (Cis, n=6), al cual se le administró una dosis única de 7.5 mg/kg de peso de cisplatina vía i.p (Al-Majed et al., 2003); 3) grupo FeTPPS (FeTPPS, n=6), al cual se le administró una dosis de 15 mg/kg de peso cada 24 horas de FeTPPS vía i.p (Onody et al., 2003) y 4) grupo cisplatina + FeTPPS (Cis+FeTPPS, n=6), al cual se le administró una dosis única de 7.5 mg/kg de peso de cisplatina vía i.p y 15 mg/kg de peso de FeTPPS vía i.p. cada 12 horas durante 3 días.

El tratamiento con FeTPPS fue por un periodo de 3 días y los animales se sacrificaron por decapitación. El peso corporal, volumen urinario y consumo de alimento se midió diariamente.

La orina recolectada de 24 horas se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se colocaron 2 alícuotas en tubos eppendorf a -74°C hasta las determinaciones correspondientes.

Al momento del sacrificio la sangre de las ratas se recolectó individualmente en tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm, se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se recolectó el suero y se prepararon alícuotas en tubos eppendorf congelándose a -74°C hasta su uso.

Uno de los riñones extraídos de cada rata se seccionó y se fijó en alcohol etílico al 95% para su posterior preparación de cortes histológicos. Otro riñón se almacenó en tubos eppendorf y se congeló a -74°C hasta su uso para determinaciones posteriores.

6.4 Determinaciones bioquímicas

6.4.1 Evaluación la función tubular

6.4.1.1 Proteinuria

La proteinuria se determinó midiendo la turbidez generada por la precipitación de las proteínas con TCA a 420 nm (Fig. 17). Se incubó 1 ml de orina diluida con agua destilada 1:5 y 250 μl de TCA al 12.5% por 10 minutos a temperatura ambiente. Para cada muestra se preparó un blanco sin TCA. Se calibró a cero el espectrofotómetro utilizando 1 mL de H_2O destilada y 250 μl de TCA al 12.5%. Para determinar la concentración se interpolaron las densidades ópticas en una curva patrón de ASB al 0.1% con una concentración de entre 0.04 y 0.8 mg/mL. Los resultados se multiplicaron por el volumen urinario de 24 horas y se expresaron como mg de proteína/24 h.

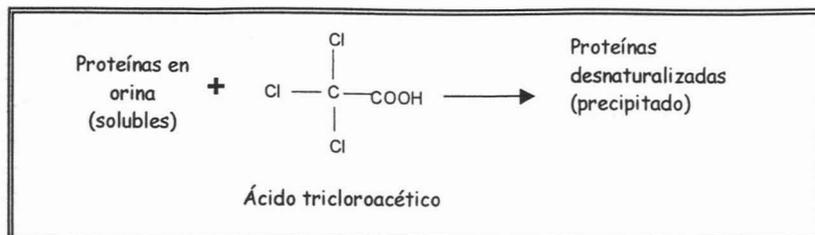


Fig. 17. Reacción entre las proteínas excretadas en la orina y el ácido tricloroacético para formar un precipitado y así medir la turbidez de la reacción a 420 nm.

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

La actividad NAG se determinó mediante un ensayo basado en la conversión del p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminido (sustrato de la enzima) en p-nitrofenol (producto de la reacción), que en medio alcalino pasa de su forma protonada a su forma aniónica (Fig. 18). Se utilizaron 50 μ l de orina, 550 μ l de amortiguador de citratos 0.05 M, pH 4.4 y 125 μ l de sustrato a una concentración final de 6.8 mM. Para cada muestra se preparó un blanco sin sustrato y para evaluar la conversión espontánea del sustrato uno sin muestra de orina. Todos los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C durante 15 min. La reacción se detuvo con 550 μ l de Na_2CO_3 0.2 M, pH 10.4 y se lee en el espectrofotómetro a 405 nm. La absorbencia de la forma aniónica del p-nitrofenol se interpoló en una curva de calibración de una solución de p-nitrofenol 0.5 mM con rangos de 5 a 175 nM. Los resultados se expresaron como unidades (U) de NAG/24 h en donde una U se define como la cantidad de enzima que libera un μ mol de p-nitrofenol por minuto.

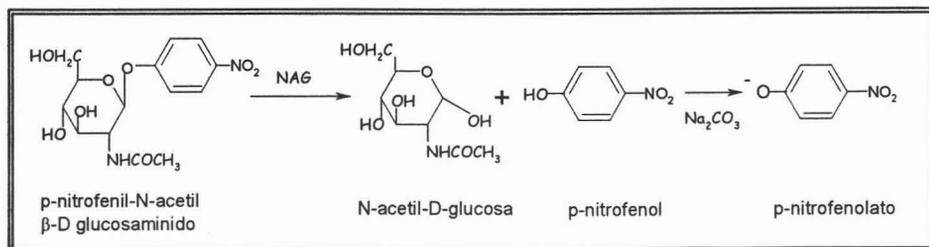


Fig. 18. Reacción de la NAG sobre el p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminido para formar el p-nitrofenol, que en medio ácido se encuentra protonado e incoloro. Al añadir carbonato de sodio a la reacción, el p-nitrofenol se transforma a su forma aniónica que absorbe a 405 nm.

6.4.2 Histología

6.4.2.1 Análisis estructural

Las secciones cortadas de riñón se fijaron en etanol al 95% durante 3 días, y se les dio el siguiente tratamiento: (1) un baño en etanol al 100% (2) un baño en etanol al 96% (3) un baño en una mezcla 1:1 de xilol-etanol y (4) dos baños en xilol durante 1 hora cada uno. A continuación las secciones de riñón se incluyeron dando 3 baños de parafina durante 1 hora cada uno. Posteriormente se realizaron cortes de tejido de 3 µm de espesor los cuales se desparafinaron con dos baños consecutivos de 3 minutos en: xilol, una mezcla 1:1 de xilol-etanol, etanol al 100%, etanol al 96%, agua destilada, hematoxilina, agua destilada, etanol al 70% con 1% de HCl, carbonato de litio, agua destilada, etanol al 96%, eosina, etanol al 96%, etanol 100%, una mezcla 1:1 de xilol-etanol y xilol. Se colocó una resina sobre la muestra y finalmente un cubreobjetos.

6.4.2.2 Cuantificación del área tubular dañada

Se analizó el daño estructural de cada una de las 24 laminillas teñidas, en un microscopio de luz Leica, seleccionando 10 túbulos en 3 campos aleatoriamente tanto en corteza renal externa como interna. El área tubular dañada se determinó mediante el programa Qwin Image Analyzer en el que cada túbulo corresponde a 100% de área. Posteriormente se seleccionaron sobre ese mismo túbulo las áreas dañadas y mediante una relación entre ambas áreas se expresó el resultado como porcentaje de área tubular dañada.

6.4.3 Evaluación de la función glomerular

6.4.3.1 Creatinina en suero

La creatinina se determinó mediante un método cinético basado en la generación de un producto de color anaranjado generado por la reacción de la creatinina con el picrato alcalino (reacción de Jaffé, Fig. 19). El producto se detecta a 492 nm y su

absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra. Se prepararon las siguientes soluciones en tubos de ensayo: un blanco con 50 μL de agua destilada, 50 μL de un estándar de creatinina de 2.0 mg/dL y 50 μL del suero de las muestras experimentales. Se adicionaron 500 μL de ácido pícrico e hidróxido de sodio (1:1), se mezclan con vórtex y se lee espectrofotométricamente a los 30 y 90 segundos. El blanco sólo se empleó para calibrar a cero. La cantidad de creatinina presente en las muestras se obtuvo por diferencia de lecturas entre los dos tiempos con aquella del estándar de creatinina y al dividir la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y multiplicar el resultado por la concentración del estándar.

Los resultados se expresaron como mg de creatinina/dL. Para la determinación de creatinina en orina se sigue en mismo método en muestras diluidas 1:50 en agua.

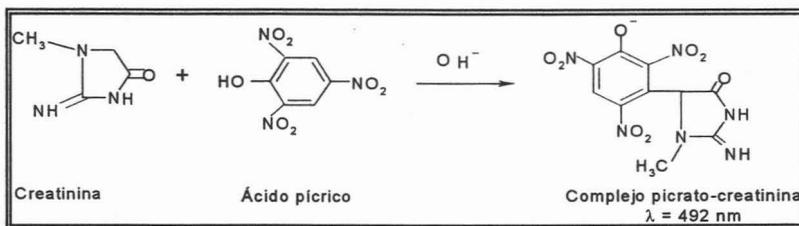


Fig. 19. Reacción de Jaffé. La creatinina reacciona con el ácido pícrico para formar un complejo colorido de creatinina-picrato el cual absorbe a 492 nm.

6.4.3.2 Nitrógeno de urea en sangre

La concentración de nitrógeno de urea en sangre, específicamente en suero, se determinó espectrofotométricamente a 510 nm (Fig. 20) con un estuche comercial de la marca Spinreact. A esta longitud de onda absorbe un producto de la reacción de la urea con el ortoftalaldehído. En un tubo se mezclaron 10 μL de la muestra de suero con 400 μL de ortoftalaldehído (4.8 mM) y 400 μL de borato (87 mM), se incubó a 37°C por 15 minutos y se midió la densidad óptica a 510 nm. En las mismas condiciones se incluyó un blanco con agua destilada en lugar de muestra experimental y 10 μL del estándar de

urea de 50 mg/dL. La concentración de urea en el suero se obtuvo al dividir la densidad óptica obtenida de la muestra entre la densidad óptica del estándar y multiplicar el resultado por la concentración del estándar de urea. Finalmente la cantidad de nitrógeno de urea se obtuvo dividiendo la concentración de urea entre 2.14 que es un factor de corrección correspondiente a la relación entre los átomos de nitrógeno y el peso molecular de la urea. Los resultados se expresan en mg/dL.

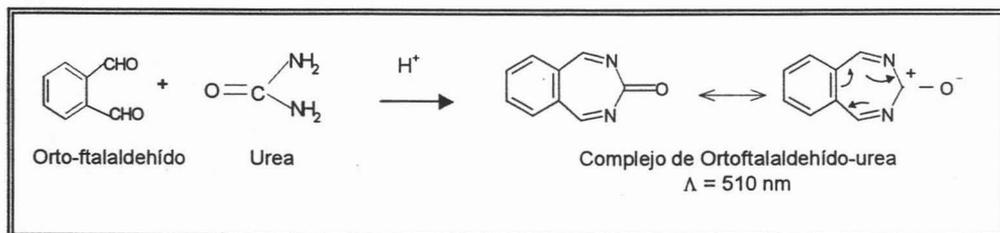


Fig. 20. Reacción entre la urea y el orto-ftalaldehído en medio ácido para producir un complejo colorido que se lee a 510 nm debido a la deslocalización de los electrones.

6.5 Estrés oxidativo

6.5.1 Cuantificación de grupos carbonilo en corteza renal

Se cuantificaron los grupos carbonilo en los homogenados de corteza de riñón (1:10) debido a que el mayor daño se localiza en esta zona. Dichos homogenados se prepararon en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7 con inhibidores de proteasas [leupeptina (5 $\mu\text{g/ml}$), pepstatina A (7 $\mu\text{g/ml}$) y aprotinina (5 $\mu\text{g/ml}$)], EDTA 1 mM y tritón X-100 al 0.1%. Los homogenados se centrifugaron y trataron con sulfato de estreptomycin al 10% por 24 h a 4°C. Se obtuvieron los sobrenadantes libres de ácidos nucleicos que se trataron con 600 μl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM disuelto en HCl 2.5 M por 1 h a temperatura ambiente (Maldonado et al., 2003). La DNPH reacciona con los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas presentes para formar un complejo proteína-hidrazona el cual absorbe a 370 nm (Fig. 21). El contenido de carbonilos de las proteínas se determinó utilizando el coeficiente de extinción del

DNPH ($2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y la concentración de proteínas determinada a 280 nm en los tubos blancos. Los resultados se expresan como nmoles de carbonilos/mg de proteína.

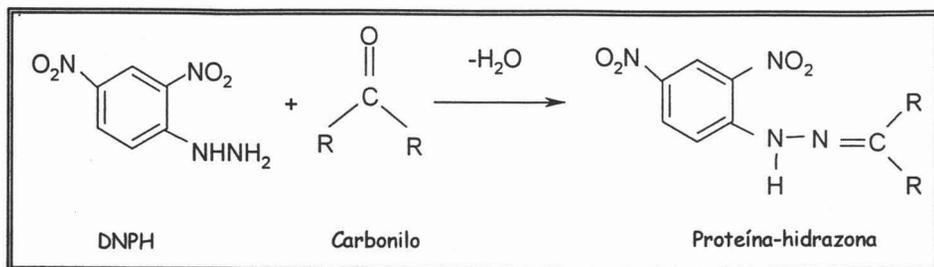


Fig. 21. Reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina y los grupos carbonilo presentes en las proteínas oxidadas para dar un complejo de proteína hidrazona, marcador de estrés oxidativo.

6.5.2 Cuantificación de MDA en corteza renal

Se cuantificó el MDA en los homogenados de corteza de riñón (1:10) debido a que el mayor daño se localiza en esta zona. Dichos homogenados se prepararon en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.4 con hidroxitolueno butilado 0.5 M en acetonitrilo y se centrifugaron a $3000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos. Se tomaron 200 μL el sobrenadante y se adicionaron 650 μL de 1-metil-2 fenilidol en acetonitrilo a una concentración final de 10 mM y posteriormente se diluyó 3:1 con metanol al 100%. Se agitó en vórtex y se adicionaron 150 μL de HCl al 37%. Por cada muestra se realizó un blanco que lleva 200 μL del sobrenadante, 650 μL de una disolución de acetonitrilo y metanol 3:1 y 150 μL de HCl al 37%. Se realizó una curva estándar a partir de una disolución de 1,1,3,3,-tetrametoxipropano (TMOP) 10 mM en Tris-HCl 20 mM pH 7.4 adicionando 650 μL de una disolución de acetonitrilo y metanol 3:1 y 150 μL de HCl al 37%. Después de incubar 50 minutos a 45°C las muestras se centrifugan a $2000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Se obtuvo el sobrenadante en el que se encuentra el MDA que al reaccionar con el 1-metil-2 fenilidol forma un complejo azul que se detecta a 586 nm (Erdelmeier et al., 1998; Gerard-Monnier et al., 1998) (Fig. 22). La

concentración de proteínas de los homogenados se determinó por el método de Lowry. La cantidad de MDA se expresó como nmol MDA/mg proteína.

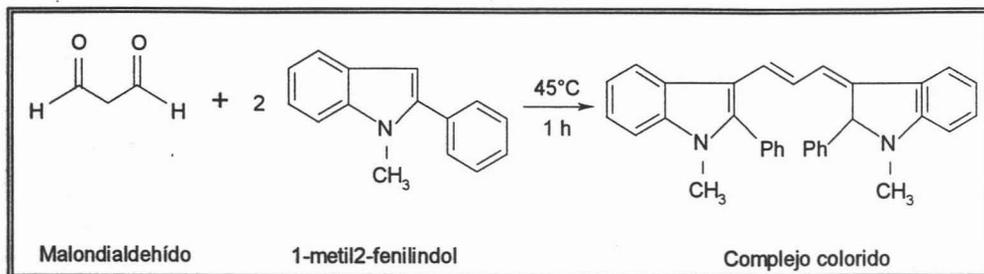


Fig. 22. Reacción entre el MDA y 1-metil-2-fenilindol para dar un complejo colorido detectable a 586 nm.

6.6 Estrés nitrosativo

6.6.1 Análisis de inmunohistoquímica de 3-nitrotirosina

Se hicieron cortes de 3 mm de riñón y se colocaron en portaobjetos para desparafinizar y posteriormente hidratar. Se incubaron los muestras con H_2O_2 al 4.5% en metanol durante 1.5 horas para inhibir las peroxidasa endógenas. Posteriormente se bloquearon con ASB al 3% en amortiguador de fosfatos pH 7.4 durante 30 minutos. Las muestras se incubaron con anticuerpo anti-nitrotirosina diluido 1:700 en una cámara húmeda. Después de la incubación se lavaron con amortiguador de fosfatos pH 7.4 (PBS) y se incubaron con un anticuerpo anti-Ig conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 por 1.5 horas. Se lavaron con PBS y se revelaron con 3,3' diaminobencidina y los tejidos se contrastaron con hematoxilina. Se vertió una resina y se colocó un cubreobjetos para su observación al microscopio. Una coloración café indica la presencia de 3-nitrotirosina.

6.7 Análisis de inmunohistoquímica de NOS

Se hicieron cortes de 3 mm de riñón y se colocaron en portaobjetos para desparafinar y posteriormente hidratar. Se incubaron los cortes con bromolevamisol durante 30 minutos para inhibir las fosfatasa endógenas. Posteriormente se incubaron los cortes con suero de cabra al 5% en con tritón al 0.3% durante 20 minutos. Los 4 grupos se incubaron con anticuerpo anti-nNOS hecho en ratón utilizando una dilución 1:25 en PBS. Otra serie de los 4 grupos se incubó con anti-iNOS hecho en ratón utilizando una dilución 1:25 en PBS y otra serie se incubó con anti-eNOS hecho en conejo utilizando una dilución 1:100 en PBS. Las 3 series se incubaron durante 12 horas a 4°C en una cámara húmeda. Después de la incubación con los anticuerpos anteriores, se realizaron 2 lavados con PBS durante 30 minutos cada uno y las 3 series se incubaron con un anticuerpo anti-Ig conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 4°C en una cámara húmeda. Las muestras se lavaron con PBS y se revelaron con rojo rápido contrastando los tejidos con hematoxilina. Se vertió una resina sobre el portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para su observación al microscopio. Una coloración rosa indica la presencia de nNOS, iNOS y eNOS.

Se realizó una cuantificación de las 3 isoformas de la NOS mediante microscopia acoplada a un software que selecciona las áreas de tinción rosa de un campo y las expresa como porcentaje de área teñida. Lo anterior representa el porcentaje de expresión de las 3 isoformas de NOS y se seleccionaron 3 campos para 2 zonas renales distintas (corteza externa e interna) aleatoriamente de las 3 series de los 4 grupos. Las imágenes se capturaron y analizaron mediante el software KS-300 versión 3.0 (Carl Zeiss, Germany).

6.8 Hibridación in situ

Para la detección del mRNA de cada una de las 3 isoformas de las NOS se utilizaron sondas de oligonucleótidos (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) que contienen un fluorocromo en el extremo 5'. La sonda antisentido de 20 bases para la

nNOS (3'-AAGTTGTCGCAGAGGAGGAT-fluoresceína-5') es complementaria a las posiciones 2736 a 2775 del mRNA de *Rattus norvegicus* correspondiente a la secuencia almacenada en GenBank con acceso número NM 052799. La sonda antisentido de 20 bases para la iNOS (3'-TCAAAGTGGTCTCTGGGTC-Rojo Texas-5') es complementaria a las posiciones 546 a 565 del mRNA de *Rattus norvegicus* correspondiente a la secuencia almacenada en GenBank con acceso número NM 012611. La sonda antisentido de 21 bases para la eNOS (3'-TACCAGTTGATAAAGGACAGG-Citocromo 5-5') es complementaria a las posiciones 1393 a 1413 del mRNA de *Rattus norvegicus* correspondiente a la secuencia almacenada en GenBank con acceso número NM 021828. Las sondas fueron resuspendidas en DEPC 1 µg/ml y almacenado a -20°C.

Las sondas fueron diluidas en DEPC (500 ng/ml) antes de la hibridación y se incubaron en los cortes renales durante 12 horas y posteriormente se lavaron durante 30 minutos con Tris 100 mM pH 7.2. Las imágenes se capturaron y analizaron mediante el software KS-300 versión 3.0 (Carl Zeiss, Germany).

6.9 Actividad de la NOS

La actividad de la NOS se midió en homogenados de corteza renal mediante la conversión de L-arginina a L-citrulina y NO. El tejido fue homogenizado en 260 mL de amortiguador 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 de EGTA, 0.1% de β-mercaptoetanol a pH 7.5 con inhibidores de proteasas. Se determinó la cantidad de proteína en el homogenado mediante el método de Lowry y se utilizaron 500 µg de proteína para el ensayo en presencia de 10 µM de L-arginina, 1 mM de NADPH, 100 nM de calmodulina, 30 µM de tetrahidrobiopterina, 2.5 mM de CaCl₂ y 0.2 µCi de [³H] L-arginina. La actividad de la iNOS se determinó en ausencia de CaCl₂ y en presencia de EDTA/EGTA 10 mM. Las muestras se incubaron en un volumen final de 100 µL durante 30 minutos a 37°C. Al término de la incubación se detuvo la reacción con 1 mL de EGTA/EDTA 2 mM, HEPES 20 mM a pH 5.5 y posteriormente se adicionan 5 mL de líquido de centelleo compuesto por POPOP (0.2 g/L), POP (4 g/L), naftaleno (60 g/L),

metanol (100 ml/L), etilenglicol (20 mL/L) y dioxano (cbp 1 L). Cada muestra se transfiere a una columna con resina de intercambio catiónico Dowex-50WX8-200 la cual retiene L-arginina (Perez-Severiano et al., 2002). En el volumen eluido se detecta la presencia de [³H] L-citrulina utilizando un contador de centelleo Beckman LS6500 durante 1 minuto. La actividad de la NOS constitutiva y de la iNOS se reportó como ng L-cit/500 mg prot/30 min.

6.10 Excreción urinaria de NO₂⁻/NO₃⁻

Se determinó la cantidad de NO₂⁻/NO₃⁻ excretados en orina tomando 150 µL de orina recolectada de día 3. Se adicionaron 75 µL de formato de amonio y 75 µL de bacteria *Escherichia coli* disuelta en amortiguador de fosfatos. Esta bacteria proporcionará la nitrato reductasa necesaria para reducir todos los NO₃⁻ a NO₂⁻. Se incubaron a 37°C durante 60 minutos en baño maría con agitación. Se determinaron los niveles de NO₂⁻/NO₃⁻ en orina mediante la reacción de Griess (Fig. 23) tomando 200 µL del sobrenadante anterior y adicionando 400 µL de ácido sulfanílico y 400 µL de N-naftiletilendiamina. Se agitó y posteriormente se leyó espectofotométricamente a 543 nm. Se preparó una curva estándar de nitrito de sodio 25 mM y se le dio el mismo tratamiento (Bartholomew, 1984; Granger et al., 1990). Los resultados se expresan como nmol de NO₂⁻/NO₃⁻/minuto.

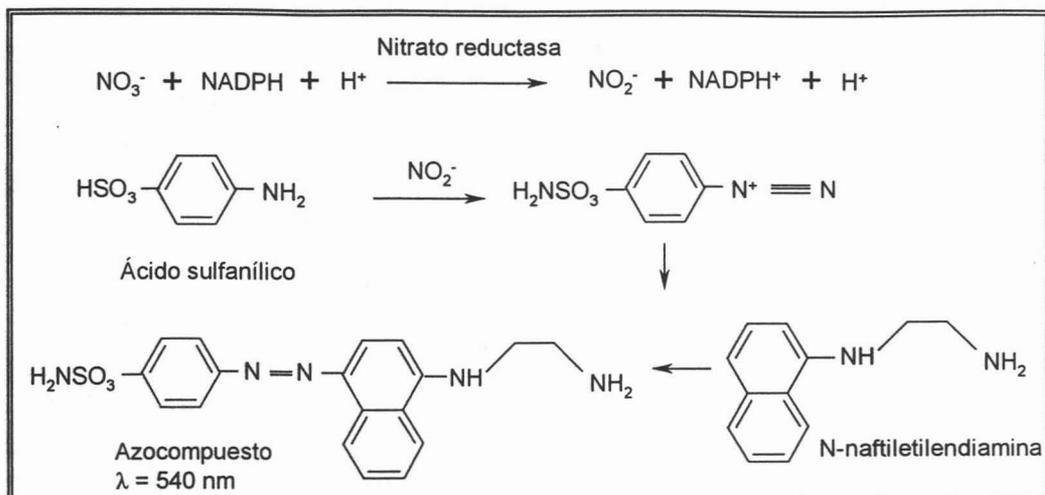


Fig. 23. Determinación de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ mediante la reacción de Griess.

6.11 Análisis estadístico

Los datos se reportaron como la media \pm error estándar de la media. Los datos se analizaron con el programa Prism 3.0 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) usando la prueba de ANOVA y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni.

7. RESULTADOS

7.1 **Peso corporal.** El peso corporal de las ratas tratadas con cisplatina disminuyó significativamente en el día 3 del estudio con respecto al grupo control (Fig. 24). Esto puede deberse, en parte, a que uno de los efectos secundarios de la administración de cisplatina es la diarrea, la cual se presentó en los animales que la recibieron. La administración de FeTPPS previno este efecto en el grupo Cis+FeTPPS.

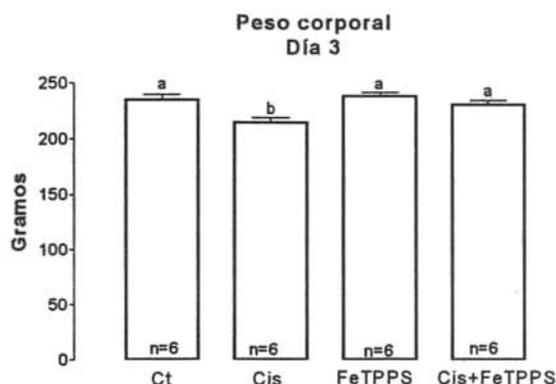


Fig. 24. Efecto de Cis, FeTPPS y Cis+FeTPPS sobre el peso corporal. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.01$).

7.2 **Volumen urinario.** La administración de Cis o FeTPPS no indujo aumento en el volumen urinario en el día 3 con respecto al control (Fig. 25).

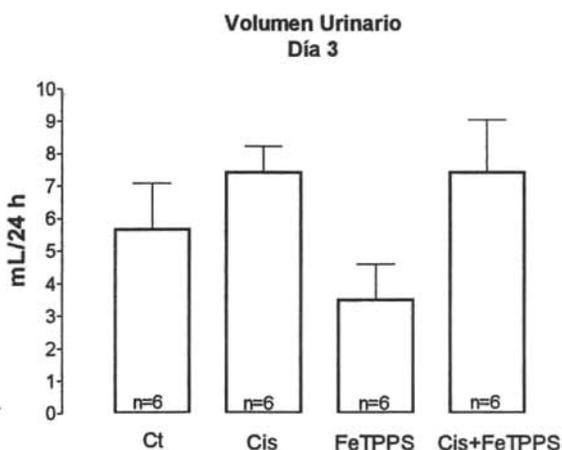


Fig. 25. Efecto de Cis, FeTPPS y Cis+FeTPPS sobre el volumen urinario. No hay diferencia estadística entre los diferentes grupos.

7.3 Evaluación de la función tubular

7.3.1 Proteinuria.

Se observó un aumento significativo de proteinuria en el día 3 en las ratas tratadas con Cis con respecto al control. La administración de FeTPPS previno este aumento en el grupo tratado con Cis+FeTPPS (Fig. 26).

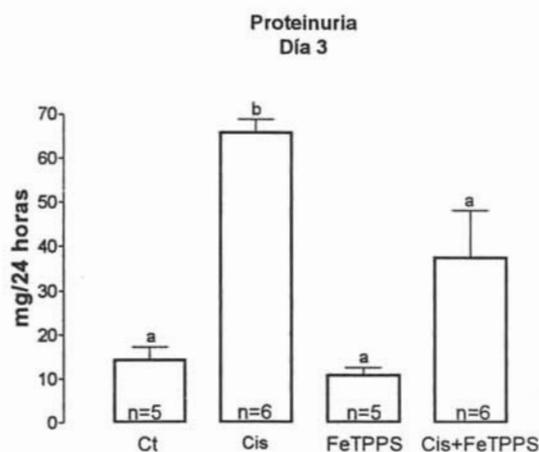


Fig. 26. Efecto de Cis, Fe y Cis+Fe sobre la proteinuria. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.001$).

7.3.2 Excreción urinaria de NAG.

La excreción urinaria de NAG aumentó significativamente en el grupo tratado con Cis con respecto al control y este efecto fue revertido tras la administración de FeTPPS (Fig. 27).

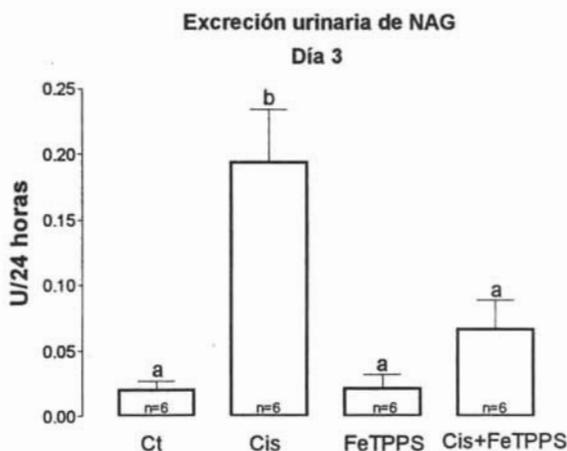


Fig. 27. Efecto de Cis, FeTPPS y Cis+FeTPPS sobre la excreción urinaria de NAG en el día 3. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.001$).

7.4 Histología.

7.4.1 Análisis histológico.

Los resultados del análisis histológico, tinción con hematoxilina & eosina e inmunohistoquímica para 3-NT mostraron lo siguiente: en comparación con la corteza renal de los animales control (CT), los animales tratados con cisplatina mostraron áreas extensas de vacuolación, edema y necrosis tubular con esfacelación lo cual afectó el $80\pm 5\%$ del revestimiento epitelial de los túbulos contorneados proximales (Fig. 28). La toxicidad de la cisplatina fue mayor aún en la porción recta de los túbulos contorneados de la unión cortico-medular, en donde el estudio morfométrico mostró que más del 95% del epitelio tubular (Fig. 28) presentó necrosis o daño celular extenso manifestado por edema y vacuolación celular, estas mismas áreas también mostraron intensa inmunotinción para 3-NT. La administración de FeTPPS disminuyó significativamente, en 50% la extensión del daño epitelial tubular de los túbulos contorneados proximales (Fig. 28) disminuyendo también de manera acentuada la inmunotinción para 3-NT (Fig. 36), mientras que en la porción recta de los túbulos contorneados (Fig. 28) la administración de FeTPPS indujo una disminución del 20% en la extensión de la superficie epitelial tubular necrótica, disminuyendo también la intensidad de la inmunotinción para 3-NT (Fig. 36). La administración exclusiva de FeTPPS no produjo ninguna anomalía histológica en los riñones (Fig. 28 y 29).

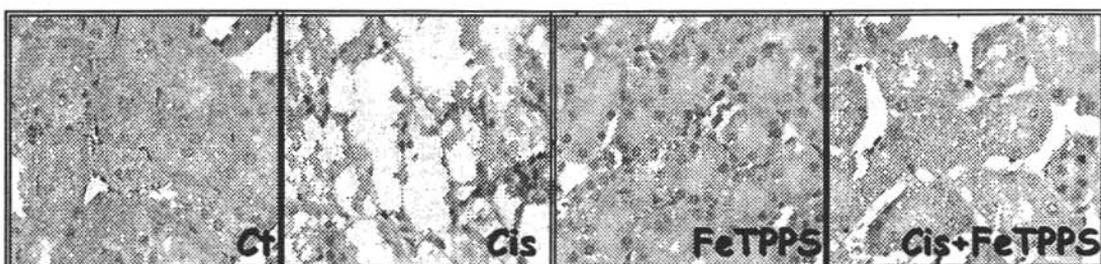


Fig. 28. Análisis histológico de corteza externa. Tinción H&E. 400X.

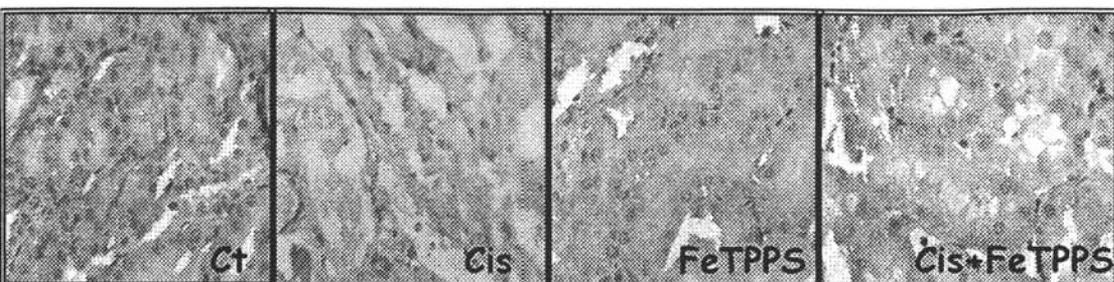


Fig. 29. Análisis histológico de corteza interna. Tinción H&E. 400X.

7.4.1.1 Cuantificación del área tubular dañada. La Figuras 28 y 29 muestran un alto porcentaje de daño en túbulo proximal debido a la administración de cisplatina y las Fig. 30 y 31 expresan el porcentaje de daño inducido por cisplatina en corteza externa e interna, respectivamente.

Daño tubular en corteza externa

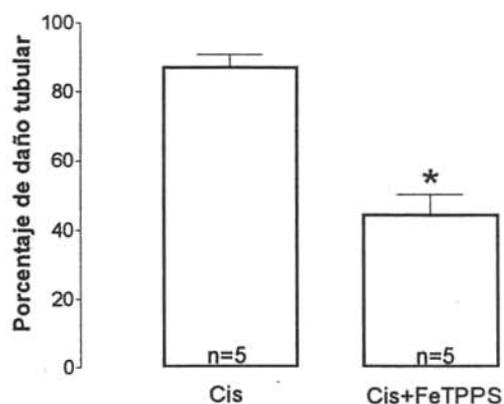


Fig. 30. Efecto de Cis+FeTPPS sobre el porcentaje de área dañada en el día 3. El grupo marcado con asterisco es significativamente diferente. * $p < 0.003$ vs. Cis.

Daño tubular en corteza interna

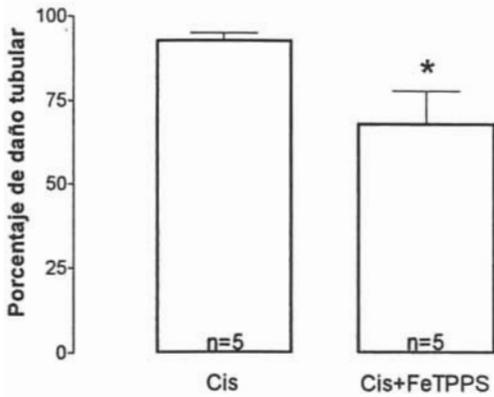


Fig. 31. Efecto de Cis+Fe sobre el porcentaje de área dañado en el día 3. * $p < 0.0409$ vs. Cis.

7.5 Evaluación de la función glomerular

7.5.1 Creatinina en suero.

La administración de Cis indujo un aumento en los niveles de creatinina en suero.

Este efecto es parcialmente prevenido con la administración de FeTPPS ya que el grupo Cis+FeTPPS es diferente significativamente del control pero también del grupo Cis (Fig. 32).

Creatinina en suero Día 3

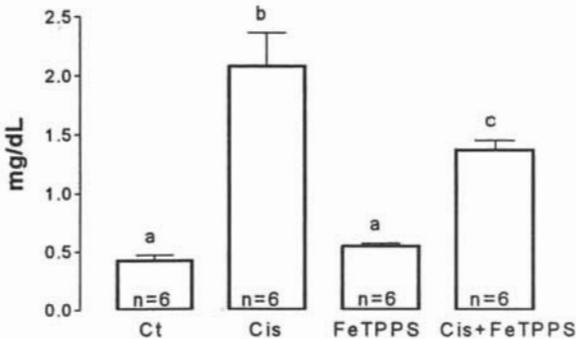


Fig. 32. Efecto de Cis, FeTPPS y Cis+FeTPPS sobre la concentración de creatinina en suero. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.001$).

7.5.2 Nitrógeno de urea en sangre. La administración de Cis indujo un incremento en la concentración de nitrógeno de urea en sangre y este efecto fue prevenido por la administración de FeTPPS de forma parcial (Fig. 33).

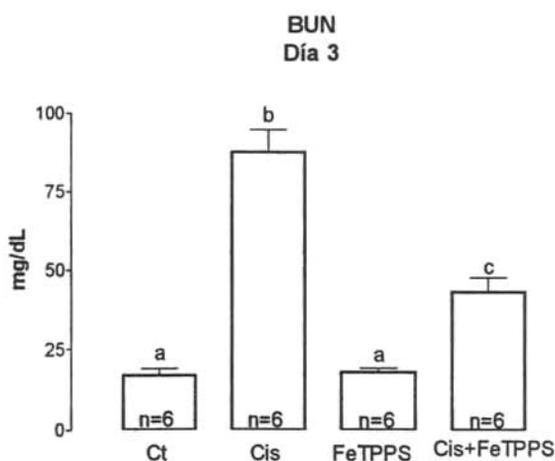


Fig. 33. Efecto de Cis, FeTPPS y Cis+FeTPPS sobre la concentración de nitrógeno de urea en sangre. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.01$).

7.6 Estrés oxidativo.

7.6.1 Proteínas oxidadas. El contenido de grupos carbonilo de las proteínas no presentó cambios significativos tras la administración de Cis (Fig. 34).

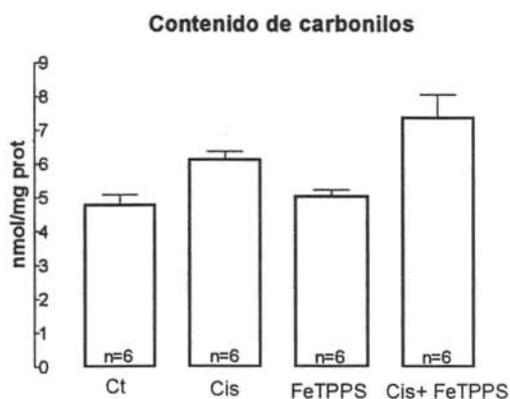


Fig. 34. Efecto de Cis, FeTPPS y Cis+FeTPPS sobre la oxidación de proteínas. No hay diferencia significativa entre los 4 grupos.

7.6.2 MDA. El contenido de MDA aumentó en el grupo tratado con cisplatina y este efecto no es prevenido por la administración de FeTPPS (Fig. 35).

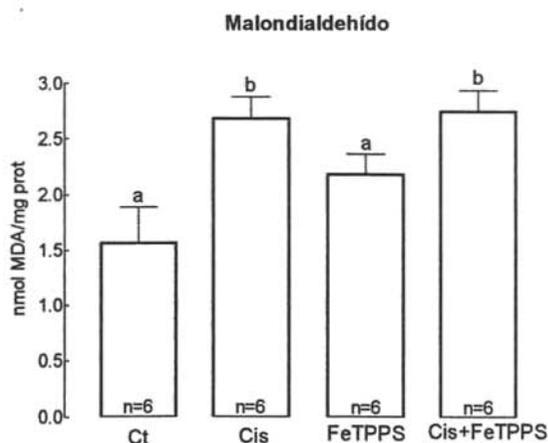


Fig. 35. Efecto de Cis, FeTPPS y Cis+FeTPPS sobre la producción de MDA.

7.7 Estrés nitrosativo. La administración de cisplatina induce un aumento en la nitración de proteínas el cual es prevenido parcialmente por la administración de FeTPPS (Fig. 36).

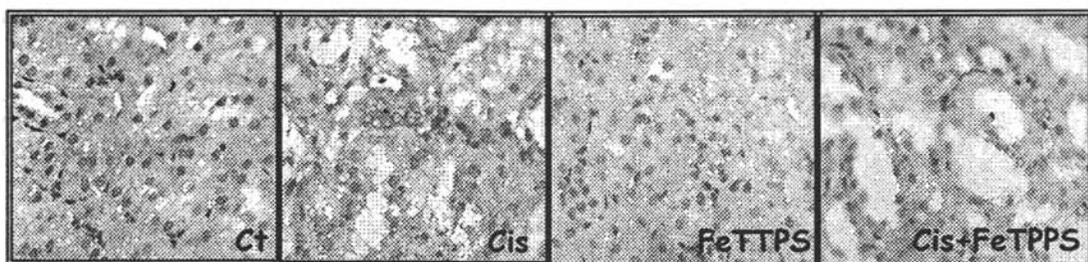


Fig. 36. Inmunohistoquímica de 3-nitrotirosina. 400X.

7.8 Expresión de NOS

7.8.1.1 Expresión de nNOS en corteza rena externa. La Fig. 37 muestra la inmunolocalización de la nNOS en la corteza renal externa. El grupo administrado con

cisplatina muestra un aumento en la tinción, mientras que la administración de FeTPPS en el grupo Cis+FeTPPS no es capaz de prevenir este aumento.

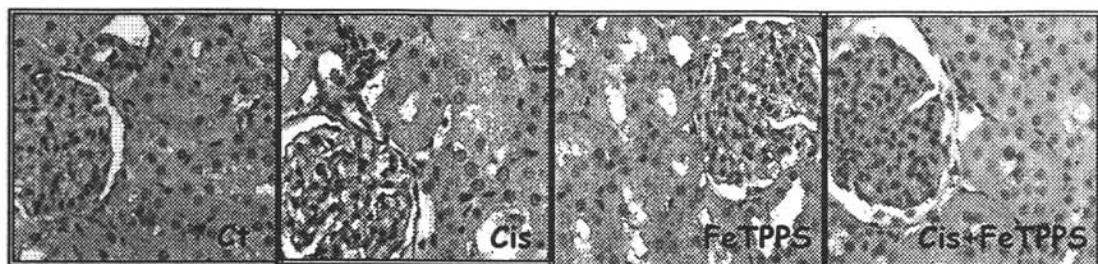


Fig. 37. Inmunohistoquímica de nNOS en corteza renal externa. 400X.

7.8.1.2 Expresión de nNOS en corteza renal interna. La Fig. 38 muestra un aumento en la expresión de nNOS en el grupo tratado con cisplatina y este aumento disminuye en el grupo Cis+FeTPPS.

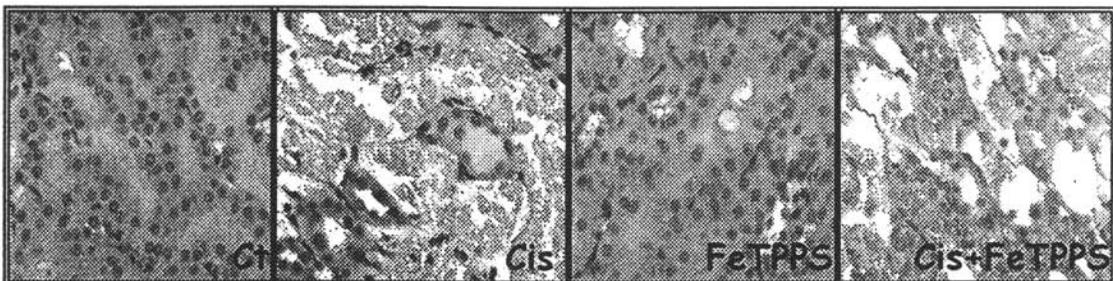


Fig. 38. Inmunohistoquímica de nNOS en corteza renal interna. 400X.

7.8.2.1 Expresión de iNOS en corteza renal externa. La Fig. 39 muestra que la administración de cisplatina induce un aumento en la expresión de la iNOS y esta inducción disminuye en el grupo de Cis+FeTPPS.

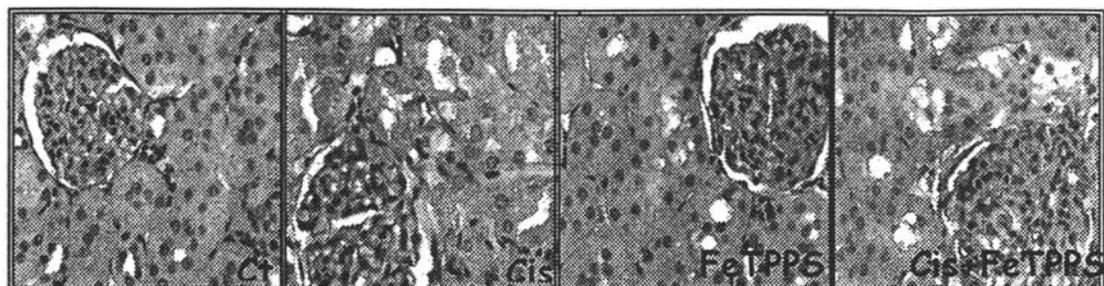


Fig. 39. Inmunohistoquímica de iNOS en corteza renal externa. 400X.

7.8.2.2 Expresión de iNOS en corteza renal interna. La Fig. 40 muestra un aumento de la expresión de iNOS en el grupo administrado con cisplatina. En el grupo tratado con cisplatina + FeTPPS este aumento continúa.

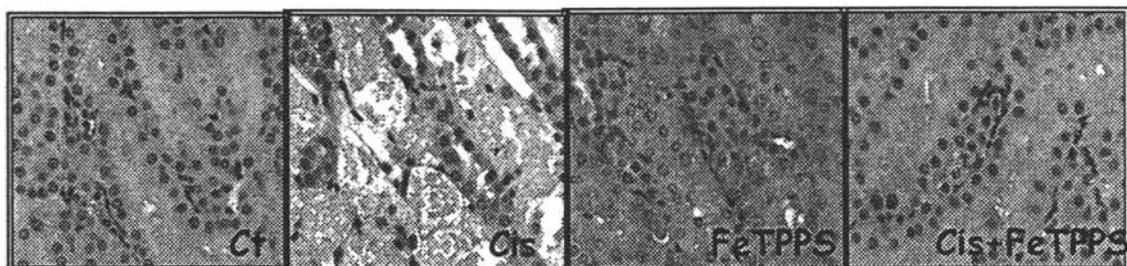


Fig. 40. Inmunohistoquímica de iNOS en corteza renal interna. 400X.

7.8.3.1 Expresión eNOS en corteza renal externa. La Fig. 41 muestra un aumento en la expresión de eNOS en el grupo tratado con cisplatina. En el grupo Cis+FeTPPS no se observan cambios con respecto al control.

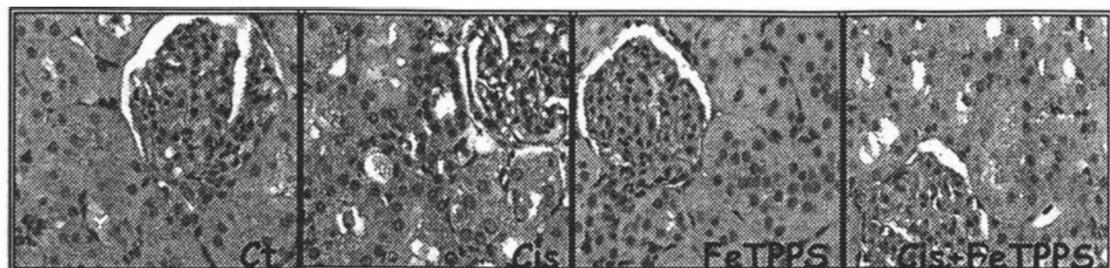


Fig. 41. Inmunohistoquímica de eNOS en corteza renal externa. 400X.

7.8.3.2 Expresión eNOS en corteza renal interna. La Fig. 42 muestra un aumento en la expresión de eNOS disminuyendo en el grupo Cis+FeTPPS.

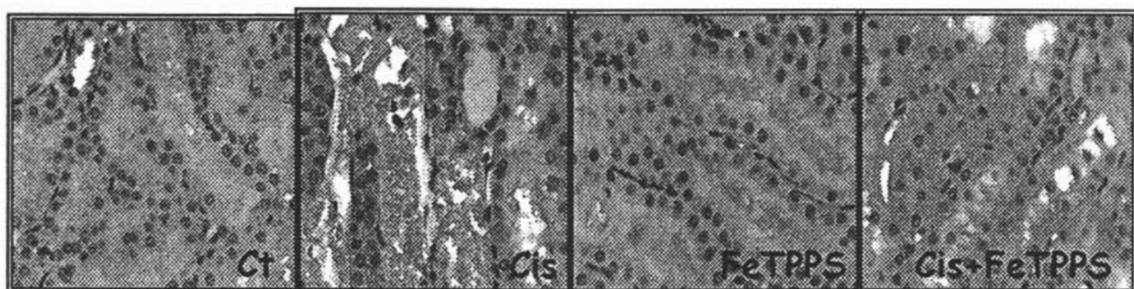


Fig. 42. Inmunohistoquímica de eNOS en corteza renal interna. 400X.

En la tabla 2 se describen los cambios en cada una de las 3 isoformas de la NOS.

Tabla 2. Cambios encontrados en la expresión de la NOS en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina.

| | Ct | Cis | FeTPPS | Cis+FeTPPS |
|-------------|---|---|---|---|
| nNOS | Se encontró inmunotinción en mácula densa, túbulos proximales y distales y menor presencia en glomérulos. | No hay aumento en la expresión en glomérulos pero si en túbulos proximales. Existe asociación entre las zonas de necrosis y la expresión de la enzima. | Patrón de expresión muy similar al control. | Hay aumento de expresión en túbulos proximales. Se observa tinción positiva en las células donde hay menor daño. |
| iNOS | Se observa expresión en túbulos proximales. | Hay un aumento muy discreto en glomérulo. Aumenta la expresión en túbulos proximales. La tinción esta asociada al daño estructural. | Patrón de expresión similar al control. | Se observa una tinción muy discreta en glomérulo y disminución en túbulos proximales con respecto al grupo administrado con cisplatina, sin embargo se observa tanto en tejido preservado como en aquel donde hay necrosis. |
| eNOS | En glomérulo hay mayor tinción con respecto a nNOS e iNOS. Se observa inmunotinción tenue en macula densa y ausencia de esta en túbulos distales. En el epitelio tubular hay presencia importante de esta isoforma. | En glomérulo aumenta ligeramente la tinción. En los túbulos proximales hay un aumento evidente. Hay presencia de la enzima en zonas donde aun el tejido esta preservado y en las zonas de necrosis. Hay un aumento de tinción importante en los túbulos distales. | Patrón de expresión similar al control. | Se mantiene el aumento de expresión en glomérulo. En túbulos proximales hay una disminución en las zonas sin daño y en aquellas que presentan necrosis tubular. |

7.9 Cuantificación de NOS.

7.9.1.1 Cuantificación de nNOS en corteza renal externa. La Fig. 43 muestra un aumento en la expresión de nNOS. La administración de FeTPPS no es capaz de prevenir este aumento.

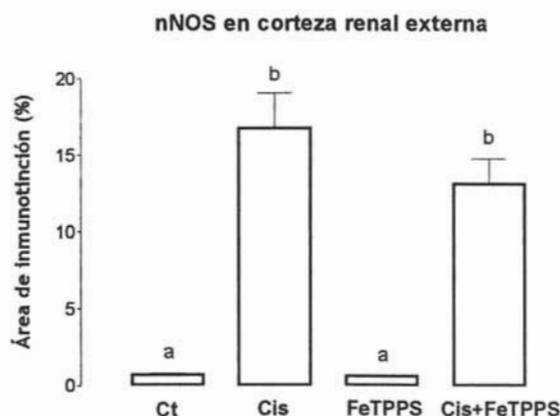


Fig. 43. Cuantificación de nNOS en corteza renal externa. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). $n=3$.

7.9.1.2 Cuantificación de nNOS en corteza renal interna. La Fig. 44 muestra un aumento en la expresión de nNOS. La administración de FeTPPS previene parcialmente este aumento.

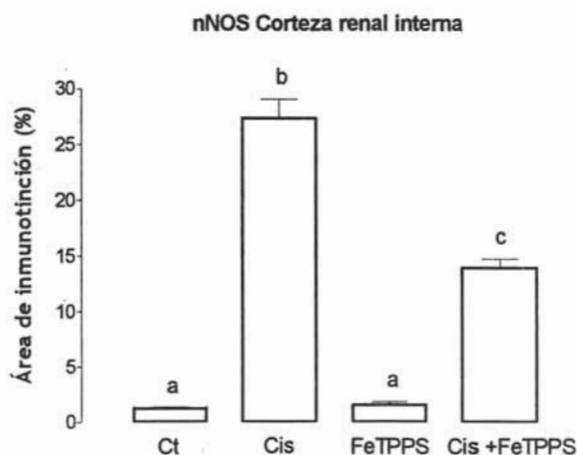


Fig. 44. Cuantificación de nNOS en corteza renal interna. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). $n=3$.

7.9.2.1 Cuantificación de iNOS en corteza renal externa. La Fig. 45 muestra un aumento en la expresión de iNOS. La administración de FeTPPS previene significativamente este aumento.

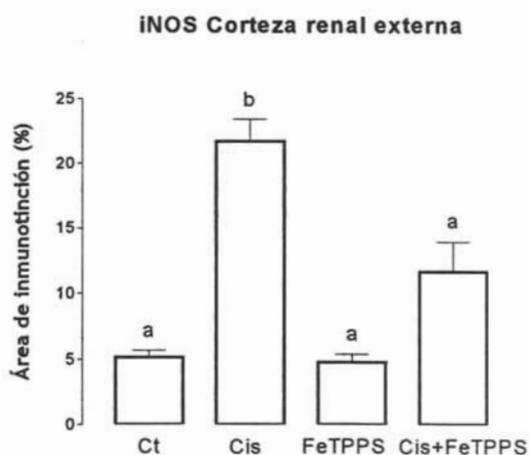


Fig. 45. Cuantificación de iNOS en corteza renal interna. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). $n=3$.

7.9.2.2 Cuantificación de iNOS en corteza renal interna. La Fig. 46 muestra un aumento en la expresión de iNOS y la administración de FeTPPS previene este aumento.

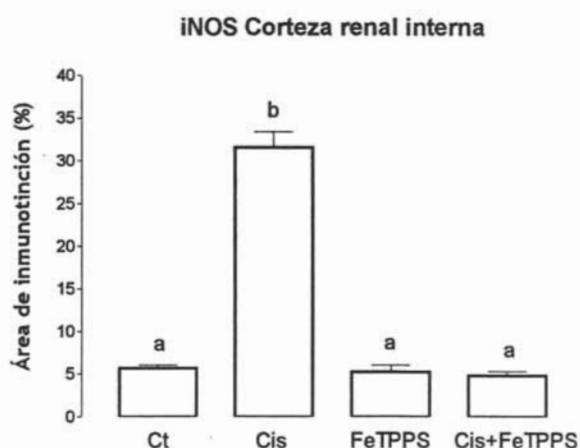


Fig. 46. Cuantificación de iNOS en corteza renal interna. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). $n=3$.

7.9.3.1 Cuantificación de eNOS en corteza renal externa. La Fig. 47 muestra un aumento en la expresión de eNOS y la administración de FeTPPS previene este aumento.

eNOS Corteza renal externa

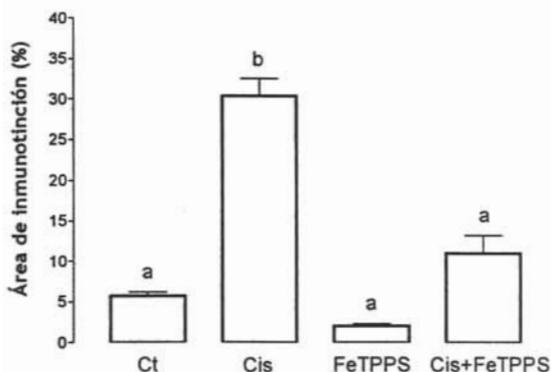


Fig. 47. Cuantificación de eNOS en corteza renal externa. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). $n=3$.

7.9.3.2 Cuantificación de eNOS en corteza renal interna. La Fig. 48 muestra un aumento en la expresión de eNOS y la administración de FeTPPS previene parcialmente este aumento.

eNOS Corteza renal interna

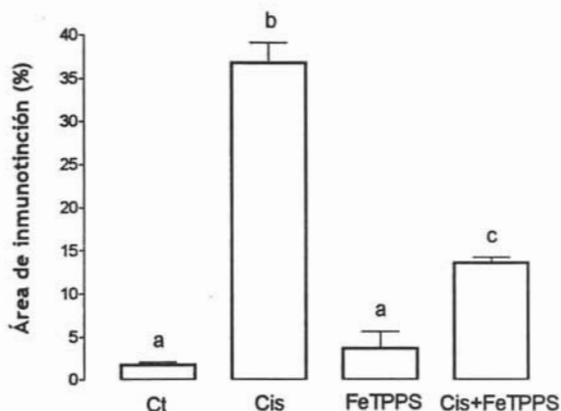


Fig. 48. Cuantificación de eNOS en corteza renal interna. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.05$). $n=3$.

7.10 El mRNA de NOS.

7.10.1.1 El mRNA de nNOS en corteza renal externa. La Fig. 49 muestra un aumento en el mRNA en el grupo con cisplatina. Este aumento se observa en glomérulo y en túbulo proximales. El grupo administrado con Cis+FeTPPS presenta un patrón similar de expresión con respecto al grupo control.

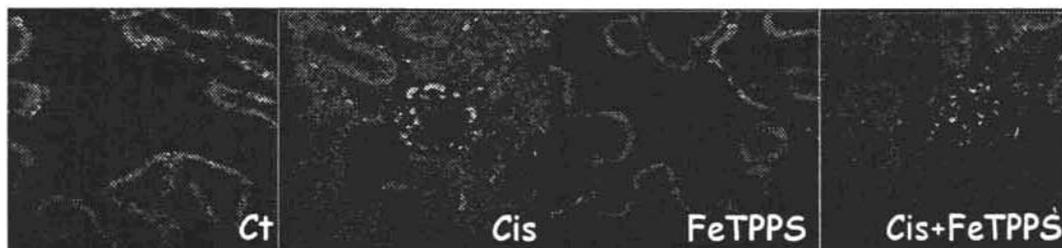


Fig. 49. mRNA de nNOS en corteza renal externa. 400X.

7.10.1.2 El mRNA de nNOS en corteza renal interna. La Fig. 50, el grupo con cisplatina muestra un aumento de mRNA en la zona tubular. Se puede observar también que en este grupo no están definidos los contornos de las células tubulares. El grupo con Cis+FeTPPS muestra un aumento en el mRNA al igual que el grupo con cisplatina, sin embargo es posible identificar las células tubulares.



Fig. 50. mRNA de nNOS en corteza renal interna. 400X.

7.10.2.1 El mRNA de iNOS en corteza renal externa. La Fig. 51 muestra el aumento de mRNA en el grupo administrado con cisplatina tanto en túbulo proximales como en glomérulos. En el grupo con Cis+FeTPPS se observa una disminución del mRNA con respecto al grupo con cisplatina.

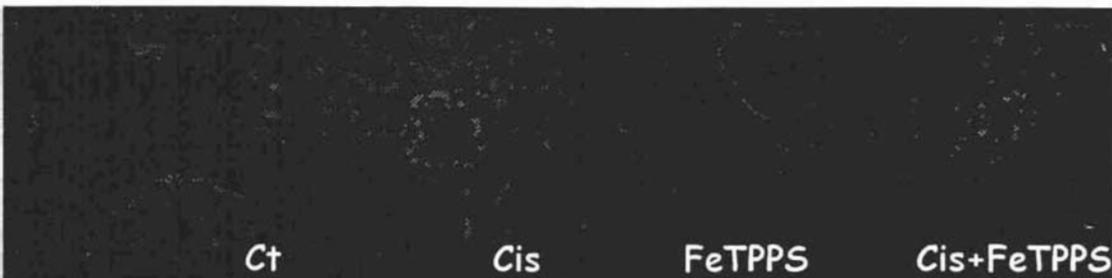


Fig. 51. mRNA de iNOS en corteza renal externa. 400X.

7.10.2.2 El mRNA de iNOS en corteza renal interna. En la Fig. 52 se observa un notable aumento del mRNA en el grupo administrado con cisplatina. La administración de FeTPPS previene este aumento en el grupo con Cis+FeTPPS.

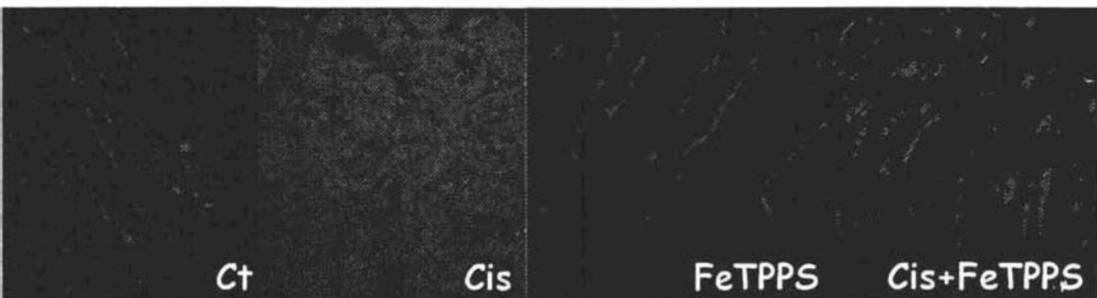


Fig. 52. mRNA de iNOS en corteza renal interna. 400X.

7.10.3.1 mRNA de iNOS en corteza renal externa. La Fig. 53 muestra un aumento importante en el grupo de cisplatina, que incluye un incremento en túbulos proximales y glomérulo. La administración de FeTPPS previene este aumento en el grupo de Cis+FeTPPS.



Fig. 53. mRNA de eNOS en corteza renal externa. 400X.

7.10.3.2 mRNA de eNOS en corteza renal interna. La Fig. 54 muestra un notable aumento en el grupo de cisplatina. La administración de FeTPPS previene este incremento en el grupo de Cis+FeTPPS.

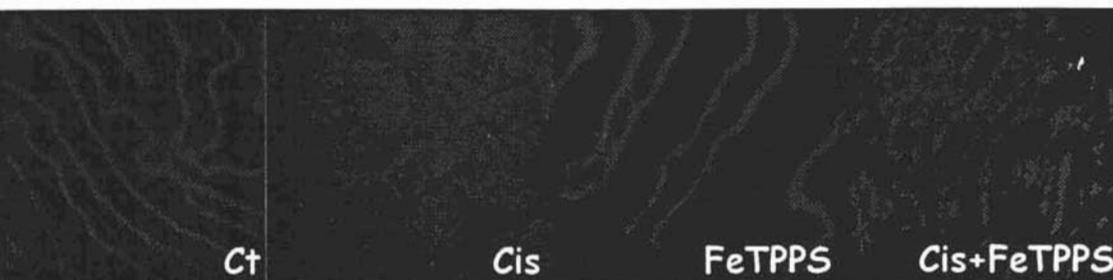


Fig. 54. mRNA de eNOS en corteza renal externa. 400X.

7.11 Cuantificación del mRNA de NOS.

7.11.1.1 Cuantificación del mRNA de nNOS en corteza renal externa. La Fig. 55 muestra la expresión de nNOS. La administración de cisplatina no induce cambios en la transcripción.

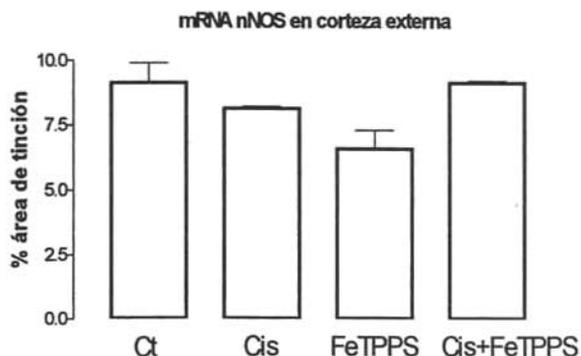


Fig. 55. Cuantificación de mRNA de nNOS en corteza renal externa. No hay diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos. n=3.

7.11.1.2 Cuantificación del mRNA de nNOS en corteza renal externa. La Fig. 56 muestra un aumento en la expresión de nNOS. La administración de FeTPPS previene parcialmente este aumento.

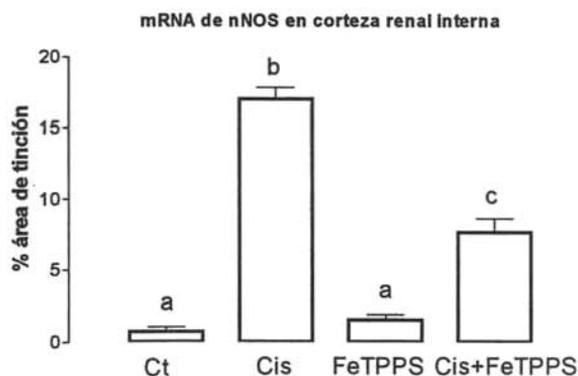


Fig. 56. Cuantificación de mRNA de nNOS en corteza renal interna. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.001$). n=3.

7.11.2.1 Cuantificación del mRNA de iNOS en corteza renal externa. La Fig. 57 muestra un aumento en la expresión de nNOS. La administración de FeTPPS no previene este aumento.

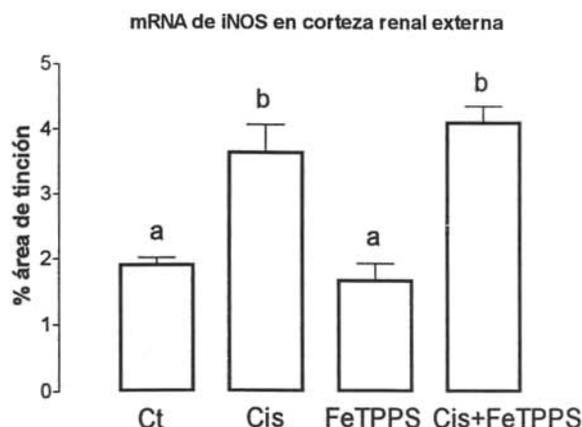


Fig. 57. Cuantificación de mRNA de iNOS en corteza renal externa. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.01$). $n=3$.

7.11.2.2 Cuantificación del mRNA de iNOS en corteza renal interna. La Fig. 58 muestra un aumento en la expresión de nNOS y la administración de FeTPPS no previene este aumento.

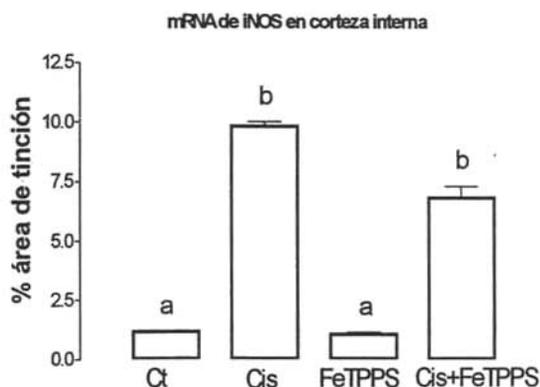


Fig. 58. Cuantificación de mRNA de iNOS en corteza renal interna. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.01$). $n=3$.

7.11.3.1 Cuantificación del mRNA de eNOS en corteza renal externa. La Fig. 59 muestra un aumento en la expresión de nNOS. La administración de FeTPPS previene parcialmente este aumento.

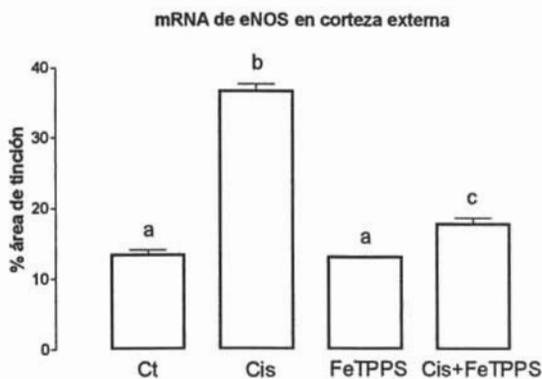


Fig. 59. Cuantificación de mRNA de eNOS en corteza renal externa. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.01$). $n=3$.

7.11.3.1 Cuantificación del mRNA de eNOS en corteza renal interna. La Fig. 60 muestra un aumento en la expresión de nNOS. La administración de FeTPPS no previene este aumento.

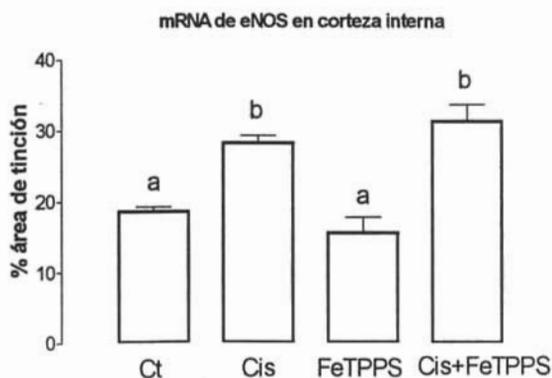


Fig. 60. Cuantificación de mRNA de eNOS en corteza renal interna. Los grupos marcados con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0.01$). $n=3$.

En la tabla 3 y 4 se resumen los cambios observados en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina en proteína y mRNA de las 3 isoformas de la NOS en corteza renal externa e interna.

Tabla 3. Cambios en proteína y mRNA de NOS en la nefrotoxicidad por cisplatina.

| | Ct | | Cis | | FeTPPS | | Cis+FeTPPS | |
|------|----------|------|----------|------|----------|------|------------|------|
| | Proteína | mRNA | Proteína | mRNA | Proteína | mRNA | Proteína | mRNA |
| nNOS | --- | --- | ↑ | --- | --- | --- | ↑ | --- |
| iNOS | --- | --- | ↑ | ↑ | --- | --- | ↓ | ↑ |
| eNOS | --- | --- | ↑ | ↑ | --- | --- | ↑ | ↓* |

Tabla 3. Cambios en proteína y mRNA de NOS en la nefrotoxicidad por cisplatina.

| | Ct | | Cis | | FeTPPS | | Cis+FeTPPS | |
|------|----------|------|----------|------|----------|------|------------|------|
| | Proteína | mRNA | Proteína | mRNA | Proteína | mRNA | Proteína | mRNA |
| nNOS | --- | --- | ↑ | ↑ | --- | --- | ↓* | ↓* |
| iNOS | --- | --- | ↑ | ↑ | --- | --- | ↓ | ↑ |
| eNOS | --- | --- | ↑ | ↑ | --- | --- | ↓* | ↑ |

* Cambio parcial

7.12.1 Actividad de cNOS. La actividad de las isoformas constitutivas, nNOS y eNOS no se ve modificada tras la administración de cisplatina a pesar de mostrar una tendencia a disminuir (Fig. 61).

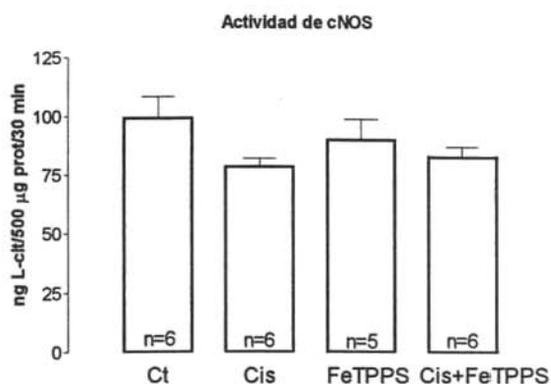


Fig. 61. La actividad de las isoformas constitutivas de la NOS no se modifica por la administración de cisplatina.

7.12.2 Actividad de iNOS. La actividad de la isoforma inducible no se ve modificada tras la administración de cisplatina a pesar de mostrar una tendencia a disminuir (Fig. 62).

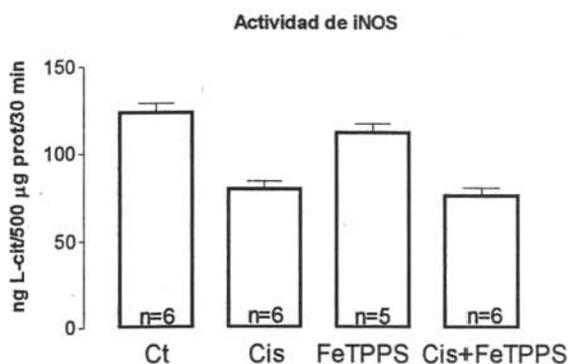


Fig. 62. La actividad de las isoformas constitutivas de la NOS no se modifica por la administración de cisplatina.

7.13 Excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. La Fig. 63 muestra la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ en donde no hay diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, puede observarse claramente que en el grupo tratado con cisplatina la excreción urinaria es prácticamente cero.

Excreción urinaria de NO_2/NO_3

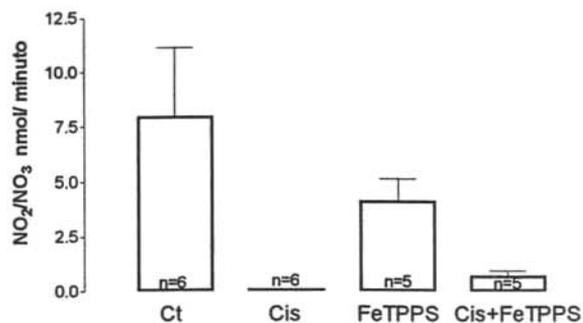


Fig. 63. Excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. No hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

8. DISCUSIÓN

La cisplatina es un agente antitumoral ampliamente usado debido a su efectividad contra una gran variedad de tumores sólidos entre los que se encuentran de testículo, ovario, pulmón, cabeza, cuello, entre otros (Merrin, 1985). Sin embargo, la nefrotoxicidad es un efecto secundario que ha limitado su uso (Davis et al., 2001). El mecanismo por el cual induce nefrotoxicidad no está completamente claro, pero existen evidencias que sustentan la participación de ERO's en el daño. Se sabe que el mecanismo de nefrotoxicidad de la cisplatina implica la formación de radicales libres que promueven lipoperoxidación y activa caspasas 1, 2, 3, 8, y 9 (Xiao et al., 2003) con lo que se induce apoptosis a bajas concentraciones de cisplatina (Baek et al., 2003) por períodos prolongados y este efecto puede ser prevenido con la administración de antioxidantes como trolox (Xiao et al., 2003) y atrapadores de OH^{\bullet} pero no de H_2O_2 . También se ha demostrado que la cisplatina induce necrosis a altas concentraciones en cultivos de células del túbulo proximal de conejo y este efecto se previene con el tratamiento de atrapadores de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (tiron), detoxificadores de H_2O_2 (catalasa y piruvato) y antioxidantes (trolox y deferoxamina) (Baek et al., 2003). Esto sugiere que el OH^{\bullet} está asociado a la apoptosis y el H_2O_2 a la necrosis inducida por cisplatina. También hay evidencias de que eventos de lipoperoxidación contribuyen a la nefrotoxicidad por este antineoplásico (Silva et al., 2001; Mansour et al., 2002).

Por otra parte, no hay evidencias de que otras especies reactivas participen en la nefrotoxicidad, como es el caso del ONOO^- , un potente oxidante, el cual se forma por la reacción entre el NO^{\bullet} y el $\text{O}_2^{\bullet-}$. El ONOO^- puede protonarse para formar el HONOO , que es un ácido capaz de oxidar un gran número de biomoléculas, y este a su vez disociarse generando los radicales NO_2^{\bullet} e OH^{\bullet} , ambos potentes oxidantes (Szabo, 2003). De tal forma, estas especies derivadas del nitrógeno han demostrado poseer propiedades oxidativas que resultan tóxicas.

Por otra parte, se ha descrito mediante diversos estudios, la capacidad del 5,10,15,20-tetrakis-[4-sulfonatofenil]-porfirinato-hierro [III] (FeTPPS) de catalizar la descomposición del ONOO⁻ (Onody et al., 2003; Trackey et al., 2001; Ferdinandy et al., 2000; Imam et al., 2000; Imam et al., 2002). De tal forma que este compuesto resulta de gran utilidad para conocer si el ONOO⁻ participa en ciertos procesos patológicos.

En la presente investigación, se estudió la contribución del ONOO⁻ en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina. El grupo tratado con cisplatina presentó una disminución significativa en el peso corporal probablemente debida a la pérdida de líquido extracelular, característico del proceso de diarrea, un efecto colateral de la administración de cisplatina. El tratamiento con cisplatina por 3 días en este modelo experimental causó alteración en los marcadores de función tubular como es el caso de proteinuria, en donde se observó un incremento. Normalmente las proteínas son filtradas en el glomérulo y posteriormente son reabsorbidas en los túbulos, pero la administración de cisplatina daña las células del túbulo proximal causando necrosis y estas células pierden la capacidad de reabsorción, por lo que en consecuencia hay un incremento de proteínas en orina. La administración de FeTPPS previene la proteinuria.

Otro marcador tubular empleado fue la excreción urinaria de NAG, ya que es una enzima lisosomal que se sintetiza en células del túbulo proximal y al ser liberada de dichas células debido a la necrosis, se observa un incremento de su actividad en orina, como fue el caso del grupo tratado con cisplatina. El FeTPPS es capaz de prevenir el aumento en la actividad urinaria de esta enzima.

La función glomerular se evaluó midiendo la concentración de creatinina en suero. La creatinina es un producto de desecho muscular que se filtra libremente, por lo tanto puede ser usado como marcador de filtración renal. La administración de cisplatina indujo un aumento en la concentración de creatinina en suero debido a la alteración de los procesos de filtración renal. El FeTPPS previene parcialmente el efecto de la cisplatina ya que el grupo Cis+FeTPPS es diferente del control pero también del grupo Cis. La urea

es un producto final del metabolismo de los aminoácidos y se sintetiza en el hígado a partir de los grupos amino de los aminoácidos y se elimina por la orina. Los niveles circulantes de urea, que se midieron como BUN y aumentaron con la administración de cisplatina, lo cual evidencia el daño glomerular. El tratamiento con FeTPPS previene parcialmente el daño glomerular causado por la administración de cisplatina.

El análisis histológico mostró que la cisplatina daña extensamente los túbulos contorneados proximales y la toxicidad es mayor aún en la porción recta de los túbulos contorneados de la unión cortico-medular. Esto se debe a que la cisplatina se reabsorbe precisamente en esta sección de la nefrona, conocida como segmentos S3. La administración de FeTPPS previene el daño inducido por la administración de cisplatina en los túbulos contorneados proximales y en menor proporción en la zona cortico-medular. Esto significa que el ONOO^- participa en la nefrotoxicidad por cisplatina y el FeTPPS provee de protección parcial, ya que el daño no es prevenido totalmente. Posiblemente el resto del daño se deba a la contribución por las especies reactivas de oxígeno, las cuales no son detoxificadas por el FeTPPS, ya que este es específico para el ONOO^- .

Debido a que el FeTPPS cataliza la descomposición de ONOO^- y su administración disminuye la nitración de proteínas en corteza renal interna, donde se localiza el principal daño por cisplatina, puede sugerirse la participación del ONOO^- en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina, así como el papel protector del FeTPPS en la nitración de proteínas.

Sin embargo, la determinación de proteínas oxidadas no mostró cambios estadísticamente significativos a pesar de existir una tendencia al aumento de carbonilos de las proteínas en el grupo que fue administrado con cisplatina. Esta tendencia se mantiene en el grupo administrado con Cis+FeTPPS. Por otra parte, la determinación de MDA, un marcador de lipoperoxidación, muestra un aumento significativo en el grupo administrado con cisplatina el cual no es capaz de ser prevenido por el FeTPPS. Esto puede deberse a que el ONOO^- puede estar participando en el daño

pero no ser el responsable absoluto de dicho daño, por lo que descomponer el ONOO^- mediante la administración de FeTPPS no resulta suficiente para prevenir el aumento de MDA.

Esta información es consistente con el hecho de que el FeTPPS, a pesar de disminuir la formación de 3-NT, no es capaz de prevenir completamente el daño estructural y funcional, lo cual indica que existen otros factores involucrados en el daño inducido por cisplatina, entre los que se encuentra el estrés oxidativo.

Los resultados sugieren entonces, que el ONOO^- puede ser, al menos en parte, responsable de los mecanismos de nefrotoxicidad inducidos por cisplatina, ya que se ha reportado en la literatura la participación del estrés oxidativo como principal responsable de la toxicidad, lo cual explicaría por qué en algunos casos, provee de protección parcial.

Por otra parte, existe evidencia para suponer que algunas patologías están relacionadas con el aumento de NO^* , lo cual podría conducir a la formación de ONOO^- al reaccionar con $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por ejemplo, la alimentación con una dieta suplementada con hierro al 2.5% en ratas macho de la cepa Wistar disminuye la L-arginina y un aumento de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$. La oclusión de la arteria cerebral media induce un decremento en los niveles de L-arginina así como un aumento en suero de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ en ambos grupos (Gamez et al., 2003). La disminución de L-arginina puede deberse a un mayor requerimiento de la NOS, ya que este aminoácido es su sustrato y el aumento de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ es la consecuencia de un aumento en su actividad, ya que son productos del metabolismo final. Otra evidencia de la alteración de la NOS en estados patológicos se encuentra en un estudio de obstrucción intestinal en animales de granja que eventualmente después de la obstrucción sufren necrosis intestinal que los conduce a la muerte. Una de las alteraciones encontradas es el aumento en la actividad de la NOS en varios órganos, entre los que se encuentra el riñón (Xilong y Lei, 2004). Esto es un indicador de que bajo condiciones patológicas puede inducirse un aumento en la actividad de la NOS y ser un

evento desfavorable para las células ya que el incremento en la síntesis de NO^* es capaz de participar en la formación de especies reactivas de nitrógeno, como el ONOO^- entre otras, que resultan citotóxicas.

La contribución del ONOO^- al efecto nefrotóxico de la cisplatina en este modelo experimental podría deberse a un aumento de la actividad de la NOS y para conocer su papel se hizo un análisis mediante inmunohistoquímica de las 3 isoformas de la NOS para saber si existían alteraciones en la cantidad de proteína y en el patrón de expresión de las NOS con la administración de cisplatina que pudieran contribuir al daño mediante un aumento en la producción de NO^* . Este análisis se realizó en corteza renal externa e interna. Además, se determinó la actividad de las isoformas constitutivas y de la isoforma inducible así como la excreción urinaria de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$.

Los resultados de la inmunohistoquímica y su cuantificación muestran un aumento de las 3 isoformas después de los 3 días de administración de cisplatina tanto en corteza externa como interna y el aumento de iNOS y eNOS es prevenido en corteza externa en el grupo administrado con FeTPPS. En corteza renal interna hay protección en el aumento de iNOS y protección parcial en el caso de nNOS y eNOS.

El aumento de las 3 isoformas de la NOS puede deberse a las alteraciones en los mecanismos de regulación inducidas por la administración de cisplatina. En el caso de la nNOS hay muchas vías de regulación entre las que se encuentran algunos de los factores de transcripción como AP-2 y NF- κ B, regulación covalente mediante fosforilaciones por proteína cinasa A, G o C así como asociación con otras proteínas como la Hsp 90 que favorece su activación.

En el caso particular de NF- κ B, se ha demostrado que la cisplatina es capaz de inducir su activación promoviendo la fosforilación de la subunidad p65 (Yeh et al., 2004). La fosforilación de dicha subunidad promueve su translocación a núcleo donde induce la transcripción de ciertos genes, entre los que se encuentran los de la nNOS. Esto podría ayudar a explicar el aumento de la nNOS en este modelo. Otra posible explicación para la

sobrerregulación de la nNOS involucra a la Hsp 90. En experimentos *in vitro* se ha encontrado que el tratamiento con geldanamicina, un inhibidor de la Hsp 90, previene la activación de la nNOS (Bender et al., 1999). De tal forma que estas proteínas de choque térmico juegan un papel importante en la regulación de la enzima, sin embargo, no se conoce si en riñón ocurren estas interacciones y más aún que puedan tener este efecto. Lo que si se ha descrito, es la presencia en riñón de 2 isoformas de la Hsp 90, la α y la β las cuales se expresan abundantemente en corteza y medula renal (Ramirez et al., 2004). Sin embargo, la actividad de las isoformas constitutivas no mostró cambios significativos. Una posible explicación para la nNOS consiste en que existen mecanismos de regulación covalente, por ejemplo, PKC, responsable de regular la actividad de la nNOS y lo hace en forma negativa. Esta proteína cinasa se activa en respuesta al aumento de Ca^{2+} citoplasmático. El cual puede ocurrir cuando el descenso de ATP es acentuado, entonces se produce la salida de iones Ca^{2+} de la mitocondria al citoplasma. Uno de los mecanismos de daño celular inducido por cisplatina, involucra precisamente la disminución de ATP que como consecuencia podría aumentar la actividad de PKC y finalmente la inactivación de la nNOS.

Por otra parte, a pesar de que la nNOS tiene funciones definidas en riñón su papel resulta controversial en algunos modelos, por ejemplo en ratas con diabetes mellitus inducida por medio de la administración de estreptozotocina, las alteraciones hemodinámicas en riñón pueden ser normalizadas por la inhibición de la nNOS utilizando un inhibidor específico, la S-metil-L-tiocitrulina en ratas uninefrectomizadas. Lo anterior sugiere que la inhibición de la nNOS puede tener un papel benéfico (Komers et al., 2004). Lo anterior puede deberse a que la producción de NO^{\bullet} en este modelo tiene un efecto perjudicial, posiblemente debido a que el NO^{\bullet} no ejerce sus funciones normales ya que puede estar en forma de otras especies que pueden llegar a ser tóxicas para las células. Además, existen numerosos reportes que muestran el aumento biomarcadores de estrés

nitrosativo, entre los que se encuentran la formación de 3-NT (DeRubertis et al., 2004; Jerums et al., 2003; Forbes et al., 2003; Onozato et al., 2002).

Sin embargo, el comportamiento de la nNOS no sólo es tejido específico, sino que no responde de igual forma aún en modelos similares. Por ejemplo, en un modelo de nefropatía diabética, la administración de insulina normaliza los cambios inducidos en ratas Munich-Wistar con diabetes mellitus, entre los que se encuentran la disminución en la sobreexpresión de la eNOS. Sin embargo, en este modelo de nefropatía diabética no hay alteración en el patrón de expresión de la nNOS (Li et al., 2004) a diferencia de los reportes de Komers et al., (2004).

Los mecanismos de regulación de la nNOS son tejido específicos y es poco lo que se ha descrito en riñón. Además, el comportamiento de esta enzima en un modelo experimental parece estar sujeto a las condiciones del mismo.

En el caso de la iNOS, los mecanismos de regulación implican un gran número de eventos y existen varios reportes en los que hay evidencia de su inducción en riñón, por ejemplo mediante lipopolisacárido (Liaudet et al., 1997), interleucina-1 β en células mesangiales (Kunz et al., 1996), isquemia renal aguda (Komurai et al., 2003), hipertensión (Kumar et al., 2005), diabetes (Fan et al., 2004), entre otras. Pero los mecanismos de forma más precisa, involucran la estabilidad del mensajero, traducción y degradación, así como otros en los que intervienen el sustrato y cofactores. Las citocinas como la IL-10 y el factor de necrosis tumoral (TNF) incrementan la transcripción de iNOS. La inducción de esta isoforma permite la síntesis de grandes cantidades de NO $^{\circ}$ que podría alterar la fisiología renal (Caglikulekci et al., 2004). Se ha informado también que el uso de SC68376, un compuesto que inhibe a p38MAPK, induce la expresión de iNOS por IL-1 β en células mesangiales (Guan et al., 1997) mientras que otro inhibidor de p38MAPK, 4-(4-fluorofenil)-2-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-pyridil)-imidazol, inhibe la expresión de iNOS estimulada por lipopolisacárido en células de glia o no tiene influencia sobre la expresión de iNOS en células DLD-1 en humano (Da Silva et al., 1997). Lo anterior puede deberse a

que las isoformas de p38MAPK ejercen diferentes funciones y se ha demostrado que en células mesangiales en riñón se expresan todas las isoformas descritas de p38MAPK (Lui et al., 2004), lo cual sugiere un estudio muy detallado de p38MAPK en la inducción de la iNOS para conocer su participación en la nefrotoxicidad por cisplatina.

Otros estudios muestran que el AMPc inhibe el incremento de proteína y mRNA de la iNOS inducido por lipopolisacárido en células gliales, sin embargo, en macrófagos, favorece la producción de NO[•] y un aumento en los niveles de proteína sin aumento en los niveles de mRNA (Won et al., 2004). El aumento en los niveles de proteína esta asociado a la disminución de la degradación de la iNOS ya que hay inhibición del sistema de ubiquitinación.

Otro mecanismo de regulación involucra modificaciones postranscripcionales de la iNOS mediante enzimas con actividad de tirosina cinasa y fosfatasa. Por ejemplo, el vanadato, un inhibidor general de tirosina fosfatasa, es usado para potenciar la actividad de tirosin cinasas. El tratamiento con vanadato en macrófagos resulta en un incremento en la actividad de la iNOS (Pan et al., 1996). Lo anterior sugiere que existen modificaciones covalentes mediadas por tirosina cinasas que pueden estar favoreciendo la actividad de la iNOS y en consecuencia el aumento de NO[•].

Lo anterior, nuevamente manifiesta la complejidad de la regulación de una enzima, además es claro que cada tejido cuenta con mecanismos diferentes incluso, para una misma enzima cuando esta se expresa en diferentes tipos celulares. Para conocer más a fondo el mecanismo exacto por medio del cual el FeTPPS previene el aumento en la cantidad de proteína y mRNA en este modelo experimental se requiere de estudios adicionales.

La forma activa de la eNOS es dimérica con un átomo de zinc tetracoordinado a 4 tioles, 2 por cada monómero de 135 Kda. La oxidación del centro zinc-tiol de este dímero conduce a una disociación de los dímeros que se traduce en producción de O₂^{•-} que podría favorecer la formación de ONOO⁻. Existen reportes que apoyan que uno de los

mecanismos por los cuales se oxida este centro involucra precisamente al ONOO^- (Zou et al., 2004). Además se ha demostrado que la inactivación de la forma dimérica de la eNOS resulta en la disminución de sus efectos como vasodilatador y antitrombótico de las prostaciclinas así como un incremento en su nitración (Zou et al., 2004). Es posible que en este modelo las prostaciclinas no sean las únicas moléculas nitradas y lo anterior en general puede contribuir a la explicación del aumento del aumento de nitración de proteínas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina así como al aumento en la cantidad de eNOS sin incremento en su actividad debido a la disociación del dímero e incluso propone a la enzima como fuente indirecta de ONOO^- .

En estudios realizados en células endoteliales aórticas de bovino se demostró que la adición de H_2O_2 causa un aumento en la producción de NO^* dosis-dependiente. A bajas concentraciones de H_2O_2 ($<50 \mu\text{M}$) este efecto puede prevenirse con la adición de quelantes de calcio. Interesantemente, altas concentraciones de H_2O_2 ($>100 \mu\text{M}$) en presencia de quelantes de calcio no son suficientes para inhibir la producción de NO^* . Además, este mismo grupo de colaboradores demostró que la producción de NO^* inducida por H_2O_2 involucra la activación inicial de ERK1/2 y posteriormente de Akt (Cai et al., 2003). Sin embargo, el mecanismo por medio del cual ERK1/2 activa a la eNOS no es claro pero existen varias alternativas. Una de ellas es que eNOS tiene numerosos sitios de fosforilación que pudieran conducir a la activación de la enzima. Otra posibilidad consiste en que ERK1/2 mediante fosforilaciones promueva la disociación de la eNOS con la caveolina-1, esta última ejerce un efecto inhibitorio sobre la eNOS al mantenerse unidas. Por otra parte, Akt es responsable de la fosforilación en la serina 1179 de la eNOS y de su consecuente activación (Cai et al., 2003). Existe otros estudios en los que se demuestra que la exposición prolongada a $50 \mu\text{M}$ de H_2O_2 de células endoteliales aórticas de porcino induce una depleción en los cofactores como FMN inactivando completamente a la eNOS (Jaimés et al., 2001). Los estudios anteriores pueden ayudar a explicar el aumento en la cantidad de proteína de las NOS en la nefrotoxicidad

inducida por cisplatina. Específicamente en el caso de la eNOS podría pensarse entonces, que el efecto de ciertas ERO's, como el H_2O_2 a bajas concentraciones es la inducción de la eNOS y que a medida que aumenta la concentración de esta especie la inducción llega a ser independiente incluso de la presencia de calcio, pero una exposición prolongada llevaría finalmente a su inactivación.

Se ha demostrado *in vivo* que la expresión de eNOS en neuronas es inducida por factores como hipoxia con la subsiguiente activación del complejo II de la cadena de transporte de electrones y canales de calcio (Henrich et al., 2004) mientras que la hipoxia intermitente durante el sueño de ratas no induce cambios de la eNOS en corteza cerebral (Li et al., 2004). Otros factores como el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 prolonga la vida media del mRNA de la eNOS (Drummond et al., 2000). La Hsp 90 parece facilitar la interacción calcio-calmodulina y de esta forma favorecer la síntesis de NO^* (García-Cardena et al., 1998). Sin embargo, si estas proteínas no interactúan de forma apropiada, la reacción catalizada por la eNOS produce $O_2^{* -}$ y H_2O_2 y en consecuencia podría formarse $ONOO^-$ (Pritchard et al., 2001). Se ha demostrado que la proteína cinasa activada por AMP en músculo esquelético y cardíaco se activa en respuesta a ejercicio o condiciones isquémicas y fosforila a la eNOS en la serina 1177 en presencia de calcio-calmodulina promoviendo su actividad (Chen et al., 1999). Sin embargo no se ha descrito si esto sucede también en riñón. Por otra parte, el estrés oxidativo inducido por hiperglicemia *in vitro* no induce cambios en la eNOS (Ulker et al., 2004).

En otros estudios, realizados en ardillas durante hibernación, se encontró una disminución tanto de la eNOS en glomérulo como en los niveles de mRNA y de actividad en riñón (Sandovici et al., 2004). Posiblemente este comportamiento de la eNOS sirva para reducir la ultrafiltración durante la hibernación. Sin embargo, no se encontraron alteraciones en la expresión de nNOS y iNOS (Sandovici et al., 2004). Esto sustenta la idea de que los mecanismos de regulación de la eNOS son complejos y están sujetos a múltiples variables.

Lo anterior sustenta la idea de que los mecanismos de regulación de la eNOS, al igual que la nNOS e iNOS son no sólo complejos, sino también tejido específicos.

Todas las interacciones que regulan la nNOS, iNOS y eNOS podrían ayudar a comprender el mecanismo por el cual la cisplatina induce un aumento en las 3 isoformas en riñón. Sin embargo, se requiere de un mayor número de estudios para su entendimiento debido a la complejidad en los mecanismos de regulación, de tal forma que la sobrerregulación de las isoformas de la NOS puede deberse, al menos en parte, a las alteraciones inducidas por el estrés oxidativo y nitrosativo, por lo que la disminución del estrés nitrosativo debida a la administración de FeTPPS, previene en algunos casos el aumento de las 3 isoformas de la NOS así como de su respectivo mRNA. El hallazgo de aumento de la NOS es relevante debido a que este podría ser otro de los mecanismos de nefrotoxicidad inducida por cisplatina, además del estrés oxidativo y nitrosativo.

A pesar del aumento de proteína y mRNA, la actividad de las 3 isoformas no se altera. Sin embargo, la excreción urinaria de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ es nula en el grupo administrado con cisplatina. Esto indicaría que no hay un aumento en la producción de NO^* pero el que se esta generando en forma constitutiva no se esta convirtiendo a sus productos finales, de tal forma que existe la posibilidad de que el NO^* que se esta produciendo se encuentre en forma de productos intermediarios. Finalmente, una de las evidencias que sustenta lo anterior en la nefrotoxicidad inducida por cisplatina, es el aumento de nitración de proteínas.

9. CONCLUSIONES

- ▣ El FeTPPS disminuye la nefrotoxicidad inducida por cisplatina sugiriendo que el ONOO⁻ está involucrado en la nefrotoxicidad por cisplatina.
- ▣ Los mecanismos de nefrotoxicidad por cisplatina involucran pasos en los que el NO[•] no es metabolizado de forma normal hasta NO₃⁻/NO₂⁻.

10. PERSPECTIVAS

- ▣ Investigar los mecanismos involucrados en la sobrerregulación de las isoformas constitutivas de la NOS en este modelo experimental.
- ▣ Explorar las posibles fuentes de anión superóxido que pudieran contribuir a la síntesis de ONOO⁻, entre ellas, la NADPH oxidasa.

11. REFERENCIAS

1. Adler A, Messina E, Sherman B, Wang Z, Huang H, Linke A, Hintze TH. NAD(P)H oxidase-generated superoxide anion accounts for reduced control of myocardial O₂ consumption by NO in old Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1015- H1022.
2. Aebi HE. Catalase, en *Methods of Enzymatic Analysis* (vol III), 3 ed. Weinheim Verlag Chemie 1982, pp 273-286.
3. Al-Majed AA, Abd-Allah AR, Al-Rikabi AC, Al-Shabanah OA, Mostafa AM. Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:146-153.
4. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6858-6862.
5. Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* 2003;142:178-186.
6. Bartholomew B. A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of *Escherichia coli*. *Food Chem Toxicol* 1984;22:541-543.
7. Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem* 1999;274:1472-1478.
8. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000;49:3-8.
9. Bolaman G, Demir Z, Balkaya S, Akalin M, Enli N. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol* 2004;23:29-34.
10. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 1999;31:577-96.
11. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:535-543.
12. Caglikulekci M, Pata C, Apa DD, Dirlik M, Tamer L, Yaylak F, Kanik A, Aydin S. The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS). *Pharmacol Res* 2004;49:227-238.
13. Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC Jr. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2003;63:325-331.
14. Chambers HF, Sande MA. Quimioterapéuticos; en Hardman JG, Limbid LE, Goodman Gilman A: Goodman & Gilman (eds): Las bases farmacológicas de la terapéutica. México, McGraw Hill Interamericana, 1996; pp 1173-1186.
15. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 1999;443:285-289.
16. Da Silva J, Pierrat B, Mary JL, Lesslauer W. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* 1997;272:28373-28380.

17. Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1511-1526.
18. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2683-2690.
19. DeRubertis FR, Craven PA, Melhem MF, Salah EM. Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. *Diabetes* 2004;53:762-768.
20. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 2000;86:347-354.
21. Eberhardt W, Kunz D, Hummel R, Pfeilschifter J. Molecular cloning of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:752-756.
22. Erdelmeier I, Gerard-Monnier D, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998;11:1184-1194.
23. Fan Q, Liao J, Kobayashi M, Yamashita M, Gu L, Gohda T, Suzuki Y, Wang LN, Horikoshi S, Tomino Y. Candesartan reduced advanced glycation end-products accumulation and diminished nitro-oxidative stress in type 2 diabetic KK/Ta mice. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:3012-3020.
24. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 2000;87:241-247.
25. Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, Cooper ME. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J* 2003;17:1762-1764.
26. Fridovich, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:13-18.
27. Gamez A, Carbonell T, Rama R. Does nitric oxide contribute to iron-dependent brain injury after experimental cerebral ischaemia? *J Physiol Biochem* 2003;59:249-254.
28. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998;392:821-824.
29. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998;11:1176-1183.
30. Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest* 1990;85:264-273.
31. Guan Z, Baier LD, Morrison AR. p38 mitogen-activated protein kinase down-regulates nitric oxide and up-regulates prostaglandin E2 biosynthesis stimulated by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 1997;272:8083-8089.
32. Guyton AC. *Tratado de Fisiología Médica*. México McGraw Hill Interamericana 1991; pp 296-301.
33. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem* 1994;269:33082-33090.
34. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987;1:358-364.
35. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992;6:2675-2683.
36. Henrich M, Paddenberg R, Haberberger RV, Scholz A, Gruss M, Hempelmann G, Kummer W. Hypoxic increase in nitric oxide generation of rat sensory neurons requires activation of mitochondrial complex II and voltage-gated calcium channels. *Neuroscience* 2004;128:337-345.

37. Howell RR, Wyngaarden JB. On the mechanism of peroxidation of uric acids by hemoproteins. *J Biol Chem* 1960;235:3544-3550.
38. Ibrahim W, Lee US, Szabo J, Bruckner G, Chow CK. Oxidative stress and antioxidant status in mouse kidney: effects of dietary lipid and vitamin E plus iron. *J Nutr Biochem* 1999;10:674-678.
39. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 1994;45:1-9.
40. Imam SZ, Islam F, Itzhak Y, Slikker W Jr, Ali SF. Prevention of dopaminergic neurotoxicity by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the prevention of methamphetamine-induced neurotoxic damage. *Ann NY Acad Sci* 2000;914:157-171.
41. Imam SZ, Newport GD, Duhart HM, Islam F, Slikker W Jr, Ali SF. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity and production of peroxynitrite are potentiated in nerve growth factor differentiated pheochromocytoma 12 cells. *Ann NY Acad Sci* 2002;965:204-213.
42. Jaimes EA, Sweeney C, Raij L. Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. *Hypertension* 2001;38:877-883.
43. Jensen MP, Riley DP. Peroxynitrite decomposition activity of iron porphyrin complexes. *Inorg Chem* 2002;41:4788-4797.
44. Jerums G, Panagiotopoulos S, Forbes J, Osicka T, Cooper M. Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. *Arch Biochem Biophys* 2003;419:55-62.
45. Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004;11:1041-1064.
46. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Anderson S. Effects of long-term inhibition of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in uninephrectomized diabetic rats. *Nitric Oxide* 2004;11:147-155.
47. Komurai M, Ishii Y, Matsuoka F, Toyama K, Ominato M, Sato T, Maeba T, Kimura K, Owada S. Role of nitric oxide synthase activity in experimental ischemic acute renal failure in rats. *Mol Cell Biochem* 2003;244:129-133.
48. Kone BC. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin Nephrol* 2004;24:299-315.
49. Konopacka M. Role of vitamin C in oxidative DNA damage. *Postepy Hig Med Dosw* 2004;58:343-348.
50. Krinsky NI. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 1989;7:617-635.
51. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2478-2480.
52. Kumar U, Chen J, Sapozhnikov V, Canteros G, White BH, Sidhu A. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 2005;27:17-31.
53. Kunz D, Walker G, Wiesenberg I, Pfeilschifter J. Inhibition by tetranactin of interleukin 1 beta- and cyclic AMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol* 1996;118:1621-1626.
54. Lee HY, Noh HJ, Gang JG, Xu ZG, Jeong HJ, Kang SW, Choi KH, Han DS. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression is increased in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated diabetic rat glomeruli: effect of ACE inhibitor and angiotensin II receptor blocker. *Yonsei Med J* 2002;43:183-192.
55. Li B, Yao J, Kawamura K, Oyanagi-Tanaka Y, Hoshiyama M, Morioka T, Gejyo F, Uchiyama M, Oite T. Real-time observation of glomerular hemodynamic changes in diabetic rats: effects of insulin and ARB. *Kidney Int* 2004;66:1939-1948.

56. Li RC, Row BW, Kheirandish L, Brittan KR, Gozal E, Guo SZ, Sachleben LR Jr, Gozal D. Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat. *Neurobiol Dis* 2004;17:44-53.
57. Liang B, Andrews L. Infrared spectra of cis-and trans-peroxynitrite anion, OONO⁻, in solid argon. *J Am Chem Soc* 2001;123:9848-9854.
58. Liaudet L, Fishman D, Markert M, Perret C, Feihl F. L-canavanine improves organ function and tissue adenosine triphosphate levels in rodent endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1643-1648.
59. Lui P, Zeng C, Acton S, Cok S, Sexton A, Morrison AR. Effects of p38MAPK isoforms on renal mesangial cell inducible nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C145-C152.
60. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 2003;35:317-324.
61. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;132:123-128.
62. Marla SS, Lee J, Groves JT. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14243-14248.
63. McArdle F, Rhodes LE, Parslew RA, Close GL, Jack CI, Friedmann PS, Jackson MJ. Effects of oral vitamin E and (beta)-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1270-1275.
64. Meister A, Tate SS. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 1976;45:559-604.
65. Merrin C. A new method to prevent toxicity with high doses of cis diammine platinum (therapeutic efficacy in previously treated widespread and recurrent testicular tumors). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1976;12:243.
66. Misko TP, Highkin MK, Veenhuizen AW, Manning PT, Stern MK, Currie MG, Salvemini D. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem* 1998;273:15646-15653.
67. Motterlini R, Green CJ, Foresti R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:615-624.
68. Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004;195:221-230.
69. Olinescu R, Smith TL. *Free radicals in medicine*. Nova Science Publishers, New York Inc 2002; 26-30.
70. Onody A, Csonka C, Giricz Z, Ferdinandy P. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet leads to enhanced peroxynitrite formation in rat hearts. *Cardiovasc Res* 2003;58:663-670.
71. Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 2002;61:186-194.
72. Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sagut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2004;24:27-35.
73. Pan J, Burgher KL, Szczepanik AM, Ringheim GE. Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: implications for potential post-translational regulation. *Biochem J* 1996;314:889-894.

74. Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J, Jo H, Beckman JS, Darley-Usmar VM. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1780-1794.
75. Perez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Rios C, Segovia J. Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res* 2002;95:36-42.
76. Pietraforte D, Salzano AM, Marino G, Minetti M. Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* 2003;25:341-350.
77. Pritchard KA, Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2001;276:17621-17624.
78. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001;30:463-488.
79. Ramirez V, Uribe N, Garcia-Torres R, Castro C, Rubio J, Gamba G, Bobadilla NA. Upregulation and intrarenal redistribution of heat shock proteins 90alpha and 90beta by low-sodium diet in the rat. *Cell Stress Chaperones* 2004;9:198-206.
80. Reyes AJ. Cardiovascular drugs and serum uric acid. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003;17:397-414.
81. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965;205:698-699.
82. Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 1985;55:2303-2316.
83. Sanchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granado F, Martin A. Consumption of high-pressurized vegetable soup increases plasma vitamin C and decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in healthy humans. *J Nutr* 2004;134:3021-3025.
84. Sandovici M, Henning RH, Hut RA, Strijkstra AM, Epema AH, van Goor H, Deelman LE. Differential regulation of glomerular and interstitial endothelial nitric oxide synthase expression in the kidney of hibernating ground squirrel. *Nitric Oxide* 2004;11:194-200.
85. Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F1144-F1152.
86. Secilmis MA, Karatas Y, Yorulmaz O, Buyukafsar K, Singirik E, Doran F, Inal TC, Dikmen A. Protective effect of L-arginine intake on the impaired renal vascular responses in the gentamicin-treated rats. *Nephron Physiol* 2005;100:13-20.
87. Silva CR, Gregg Antunes LM, Bianchi ML. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 2001;43:561-566.
88. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995;270:296-299.
89. Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997;1:373-385.
90. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003;140-141:105-12.
91. Terentis AC, Thomas SR, Burr JA, Liebler DC, Stocker R. Vitamin E oxidation in human atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2002;90:333-339.
92. Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney en *The Kidney*. Brenner BM and Rector FC Jr. *Brenner Saunders Co., Philadelphia* 2000;3-67.
93. Trackey JL, Uliasz TF, Hewett SJ. SIN-1-induced cytotoxicity in mixed cortical cell culture: peroxynitrite-dependent and -independent induction of excitotoxic cell death. *J Neurochem* 2001;79:445-455.

94. Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Hirakata H, Iida M. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F208-F218.
95. Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Antioxidant vitamins C and E ameliorate hyperglycaemia-induced oxidative stress in coronary endothelial cells. *Diabetes Obes Metab* 2004;6:442-451.
96. Ulubas B, Cimen MY, Apa DD, Saritas E, Muslu N, Cimen OB. The protective effects of acetylsalicylic acid on free radical production in cisplatin induced nephrotoxicity: an experimental rat model. *Drug Chem Toxicol* 2003;26:259-570.
97. Werner A. Beitrag zur konstitution anorganischer verbindungen. *Zeiter Anorgan Chem* 1893;3:207-330.
98. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000;7:53-58.
99. Won JS, Im YB, Singh AK, Singh I. Dual role of cAMP in iNOS expression in glial cells and macrophages is mediated by differential regulation of p38-MAPK/ATF-2 activation and iNOS stability. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1834-1844.
100. Wu R, Laplante MA, De Champlain J. Prevention of angiotensin II-induced hypertension, cardiovascular hypertrophy and oxidative stress by acetylsalicylic acid in rats. *J Hypertens* 2004;22:793-801.
101. Xiao T, Choudhary S, Zhang W, Ansari NH, Salahudeen A. Possible involvement of oxidative stress in cisplatin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells. *J Toxicol Environ Health A* 2003;66:469-479.
102. Xie Z, Wei M, Morgan TE, Fabrizio P, Han D, Finch CE, Longo VD. Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42 and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci* 2002;22:3484-492.
103. Xilong L, Lei S. Changes of tissue endothelin-1 and nitric oxide synthase in a sheep model of large intestinal obstruction. *Vet Res Commun* 2004;28:719-725.
104. Yeh PY, Yeh KH, Chuang SE, Song YC, Cheng AL. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF-kappaB activation by protein phosphatase 4-mediated NF-kappaB p65 Thr dephosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:26143-26148.
105. Zhang W, Kuncewicz T, Yu ZY, Zou L, Xu X, Kone BC. Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol Scand* 2003;179:137-142.
106. Zhu QY, Huang Y, Chen ZY. Interaction between flavonoids and alpha-tocopherol in human low density lipoprotein. *J Nutr Biochem* 2000;11:14-21.
107. Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* 2004;11:89-97.

Research article

Open Access

Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats

Yolanda I Chirino¹, Rogelio Hernández-Pando² and José Pedraza-Chaverri*¹

Address: ¹Departamento de Biología, Facultad de Química, Edificio B, Segundo Piso, Lab 209, Ciudad Universitaria, UNAM, México D.F. México and ²Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" 14000, México, D.F. México

Email: Yolanda I Chirino - irasema_chirino@hotmail.com; Rogelio Hernández-Pando - rhdezpando@hotmail.com; José Pedraza-Chaverri* - pedraza@servidor.unam.mx

* Corresponding author

Published: 30 September 2004

Received: 22 July 2004

BMC Pharmacology 2004, 4:20 doi:10.1186/1471-2210-4-20

Accepted: 30 September 2004

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/4/20>

© 2004 Chirino et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Oxidative stress is involved in cisplatin-nephrotoxicity. However, it has not completely established if reactive nitrogen species and nitrosative stress are involved in this experimental model. The purpose of this work was to study the role of peroxynitrite, a reactive nitrogen specie, in cisplatin-nephrotoxicity using the compound 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinato iron (III) (FeTPPS), a soluble complex able to metabolize peroxynitrite.

Results: In rats treated with cisplatin (a single intraperitoneal dose of 7.5 mg/kg body weight), renal nitrosative stress was made evident by the increase in 3-nitrotyrosine on day 3. In addition, cisplatin-induced nephrotoxicity was evident by the histological damage of proximal tubular cells and by the increase in (a) serum creatinine, (b) blood urea nitrogen, and (c) urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and total protein. Cisplatin-induced nitrosative stress and nephrotoxicity were attenuated by FeTPPS-treatment (15 mg/kg body weight, intraperitoneally, every 12 hours for 3 days).

Conclusions: Nitrosative stress is involved in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Our data suggest that peroxynitrite is involved, at least in part, in cisplatin-induced nephrotoxicity and protein nitration.

Background

Cisplatin (cis-dichlorodiammine-platinum II) is an effective antineoplastic agent in the treatment of various solid tumours [1] including cancers of the ovary, testis, bladder, head, neck, lung, cervix, and endometrium [2]. Nevertheless, its full clinical utility is limited due to some adverse side effects including acute renal failure. The major site of renal injury is the S3 segment of the proximal tubule, located in the outer stripe of the outer medulla of the kidney [1]. The production of reactive oxygen species (ROS)

and oxidative stress in kidney have been implicated in the pathogenesis of cisplatin-induced renal injury [3]. It has been shown that superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) [4], hydrogen peroxide (H_2O_2) [5], and hydroxyl radical ($\cdot OH$) [6] are involved in cisplatin-induced nephrotoxicity. In addition, it has been found that renal lipid peroxidation [5,7] is increased and glutathione is decreased [8] in this experimental model. The involvement of oxidative stress is further supported by the fact that the antioxidants melatonin [9] and vitamins C and E [5,10] prevent cisplatin-induced

nephrotoxicity. Interestingly, overexpression of heme oxygenase-1 ameliorates [11] and heme oxygenase-1 deficiency [12] aggravates renal damage induced by cisplatin, supporting additionally the involvement of oxidant stress in this experimental model.

On the other hand, the role of reactive nitrogen species (RNS) and nitrosative stress has been less explored in cisplatin-induced nephrotoxicity. In this context, it has been studied the role of nitric oxide (*NO) and nitric oxide synthase (NOS) [13-19]. It has been found that the renal content of total nitrate/nitrite is increased in cisplatin-treated rats [18,19] suggesting that *NO production is enhanced in these animals. Furthermore, the inhibition of NOS by L-NAME [14] or by aminoguanidine [13] decreased renal damage induced by cisplatin, suggesting that *NO is playing a toxic role in this experimental model. However, it is unknown if peroxynitrite (ONOO⁻), a RNS that is generated by the reaction of *NO and O₂^{*}, is involved in the renal damage induced by cisplatin. It has been shown that ONOO⁻, which is not a free radical, is involved in the pathogenesis of many diseases [20-25]. ONOO⁻ can react with different biomolecules including amino acids such as cysteine, methionine, tryptophan, and tyrosine leading to changes in protein structure and function [26]. ONOO⁻ has been shown to cause lipid peroxidation, chemical cleavage of DNA, and reduction in cellular defenses by oxidation of thiol pools [27].

In this work, we studied if ONOO⁻ is involved in the nephrotoxicity induced by cisplatin by using 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinato iron (III) (FeTPPS). This compound is a water-soluble Fe (III) porphyrin complex that catalyzes rapid isomerization of ONOO⁻ to nitrate (NO₃⁻) under physiologically relevant conditions (pH 7.4, 37°C) [28]. The cytoprotective actions of FeTPPS have been characterized [29].

Results

Body weight and urinary volume

Body weight decreased 8.5% in cisplatin (Cis) group on day 3 and FeTPPS tended to prevent this decrease in Cis+FeTPPS group, however there was no significant difference between Cis and Cis+FeTPPS groups. Body weight was similar in control (Ct), FeTPPS, and Cis+FeTPPS groups. Urinary volume was not significant difference among the four groups along the study and on day of sacrifice (Table 1).

Markers of glomerular and tubular damage

Serum creatinine increased 4.9 times and blood urea nitrogen (BUN) increased 5.5 times in Cis group compared to control one (Fig 1). FeTPPS prevented partially the increase in serum creatinine and BUN levels in Cis+FeTPPS group. Cisplatin increased urinary excretion

Table 1: Body weight and urinary volume in the 4 groups of rats studied on day 3.

| | Ct | Cis | FeTPPS | Cis+ FeTPPS |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Body weight (g) | 235 ± 5 ^a | 215 ± 4 ^b | 238 ± 3 ^a | 231 ± 4 ^a |
| Urinary volume (mL/24 h) | 5.7 ± 1.4 ^a | 7.4 ± 0.8 ^b | 3.5 ± 1.1 ^a | 7.4 ± 1.6 ^a |

Values are mean ± SEM, n = 6. Groups with different letter are significantly different (P < 0.05).

of total protein (4.6 times) and N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) (9.6 times) (Fig 2A and 2B). The increase in both parameters was prevented by FeTPPS in Cis+FeTPPS group (Fig 2). Serum creatinine, BUN, and urinary excretion of total protein and NAG were similar in Ct and FeTPPS groups (Figs 1 and 2).

Histological analysis

After three days of cisplatin-treatment, the epithelium from proximal convoluted tubules (tubules with small lumen area and taller epithelial cells) showed cytoplasmic vacuolization, intracellular edema and extensive damage which affected 87 ± 4% of their surface area (Fig 3B). The cisplatin toxic activity was higher in the straight portion of proximal convoluted tubules located in the inner area of the kidney cortex, where more than 90% of the epithelial surface suffered damage (Fig 4B). Interestingly, FeTPPS administration partially decreased the damaged area from 87 ± 4 to 44 ± 6% (p < 0.0001) in proximal convoluted tubules (Fig 3D) and from 93 ± 2 to 68 ± 10 (p < 0.0001) in the straight portion (Fig 4D). The administration of FeTPPS did not produce any histological alteration in the kidneys (Figs 3C and 4C). At the light microscopy level, glomeruli structure remained unchanged in all groups.

Immunohistochemical localization of 3-nitro-L-tyrosine (3-NT)

A strong 3-NT immunostaining was observed in the straight portion of the proximal convoluted tubules located in the inner area of the kidney cortex of cisplatin-treated rats (Fig 5B). Interestingly, in the Cis+FeTPPS group, FeTPPS administration partially prevented the cisplatin toxic damage in the epithelium from the proximal convoluted tubules and its straight portion respectively, in coexistence with an evident decrease of 3-NT immunostaining (Fig 5D).

Discussion

Cisplatin is an effective chemotherapeutic agent for a wide variety of tumors, nevertheless, nephrotoxicity is the major complication of this antineoplastic treatment [1]. The mechanism by which cisplatin causes renal damage is unclear, however, it has been postulated that oxidative

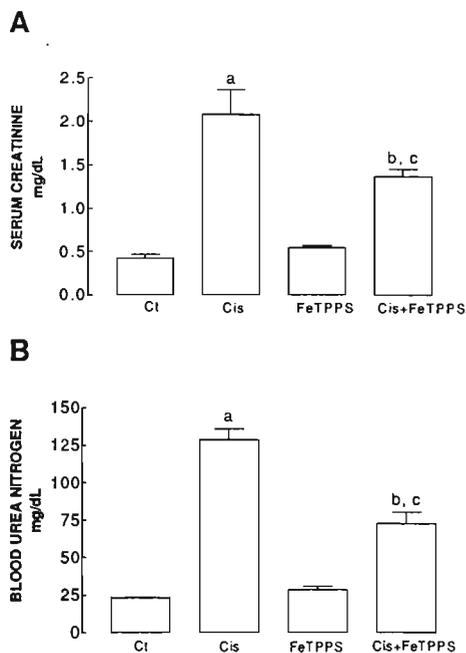


Figure 1
 (A) Serum creatinine and (B) BUN on day 3 in the four groups of rats studied. Ct: control group, Cis: cisplatin group; FeTPPS: 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrinato iron (III) group, and Cis+FeTPPS: cisplatin+5,10,15,20-tetrakis(4'-sulfonatophenyl) porphyrinato iron (III) group. Data are mean \pm SEM. n = 6. ^aP < 0.001 vs. Ct; ^bP < 0.001 vs. Ct, ^cP < 0.05 vs. Cis (Panel A); ^aP < 0.001 vs. Ct; ^bP < 0.001 vs. Ct, ^cP < 0.001 vs. Cis (Panel B). Serum creatinine and BUN increased in cisplatin group and FeTPPS prevented these increases in the Cis+FeTPPS group.

stress is involved in this process [2,3,13,30]. The protective effect of overexpression of Mn-SOD [4] or the *in vivo* administration of some antioxidants such as vitamins C and E [5,10], melatonin [9], or selenium [31] in cisplatin-induced nephrotoxicity as well as the protective effect of iron (a cell permeable O₂^{•-} scavenger), pyruvate and catalase (H₂O₂ scavengers), and dimethylthiourea and thiourea (*OH scavengers) in renal proximal tubular epithelial cells (LLC-PK1 cells) treated with cisplatin also strongly support the role of ROS in cisplatin renal toxicity [30].

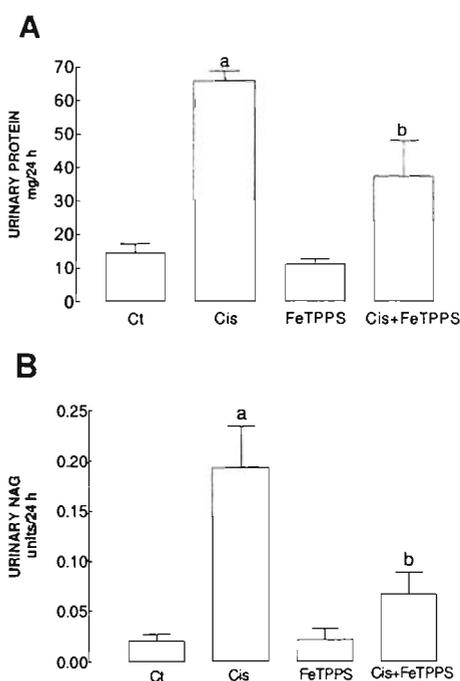


Figure 2
 Urinary excretion of (A) total protein and (B) NAG on day 3 in the four groups of rats studied. Data are mean \pm SEM. n = 5-6. ^aP < 0.001 vs. Ct, ^bP < 0.05 vs. Cis. Cisplatin-treated rats increased urinary excretion of total protein and NAG and these increases were prevented by FeTPPS administration in Cis+FeTPPS group.

In contrast the role of *NO and RNS in cisplatin-induced nephrotoxicity has not been completely established. It has been shown that the renal content of nitrate/nitrite is increased in cisplatin-treated rats suggesting that *NO is increased in these animals [18,19]. In fact it has been shown that renal NOS activity is increased in cisplatin-treated rats [14]. In addition, the following two experiments suggest a toxic role of *NO on cisplatin-induced renal toxicity: (a) aminoguanidine, an inhibitor of inducible NOS, decreased nephrotoxicity and prevented kidney lipid peroxidation and reduction of antioxidant enzymes induced by cisplatin [13], and (b) the administration of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of NOS, reduced renal and gastrointestinal toxicity along with a significant inhibition in lipid peroxidation

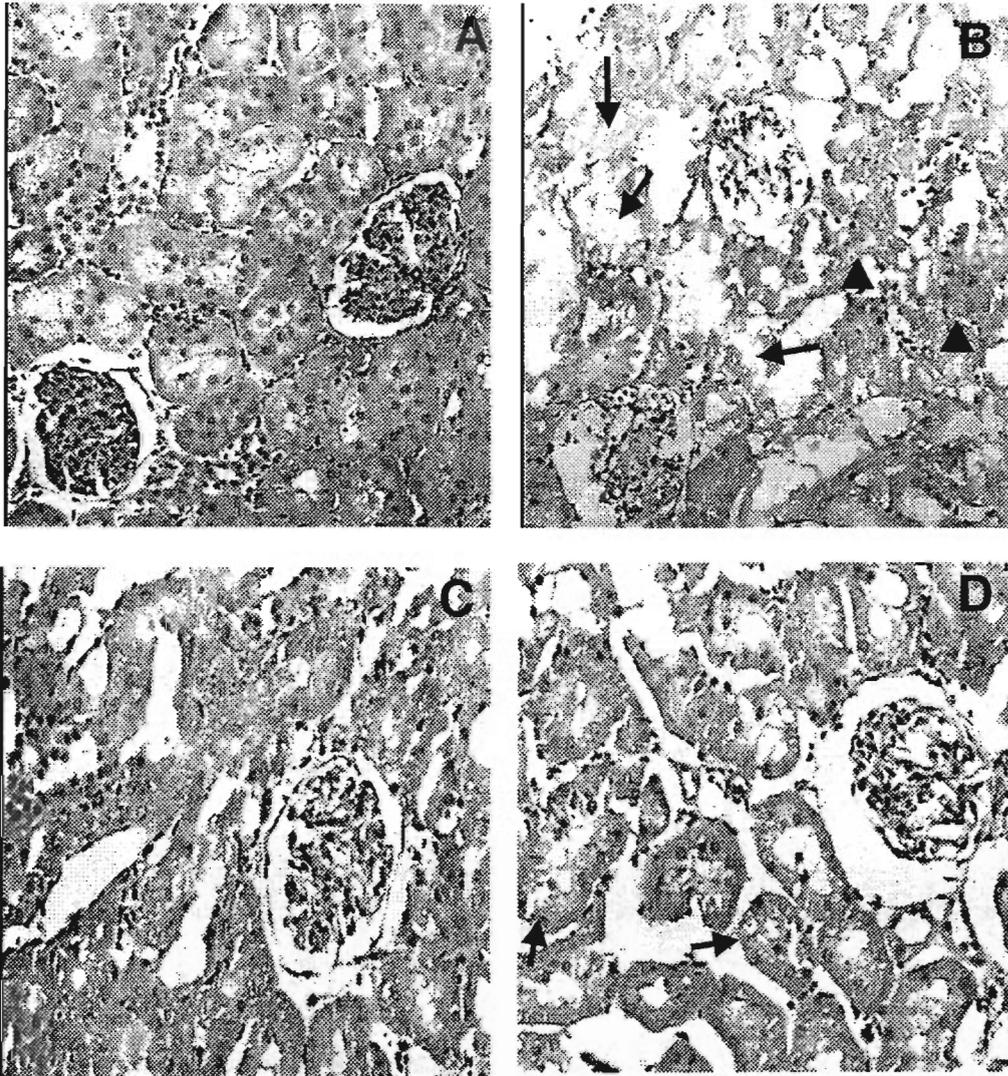


Figure 3

Representative histological abnormalities in the external cortical kidney area after three days of cisplatin administration and their partial prevention by FeTPPS. (A) Normal kidney histology from control rat. (B) After three days of cisplatin administration, many cortical convoluted tubules are revisited by necrotic epithelial cells (arrows) or vacuolated swell cells (arrow heads), glomeruli do not show apparent damage. (C) FeTPPS administration does not produce histological kidney abnormalities. (D) The administration of FeTPPS partially prevents the cytotoxic damage induced by cisplatin; arrows indicate middle cellular vacuolization of cortical convoluted tubules.

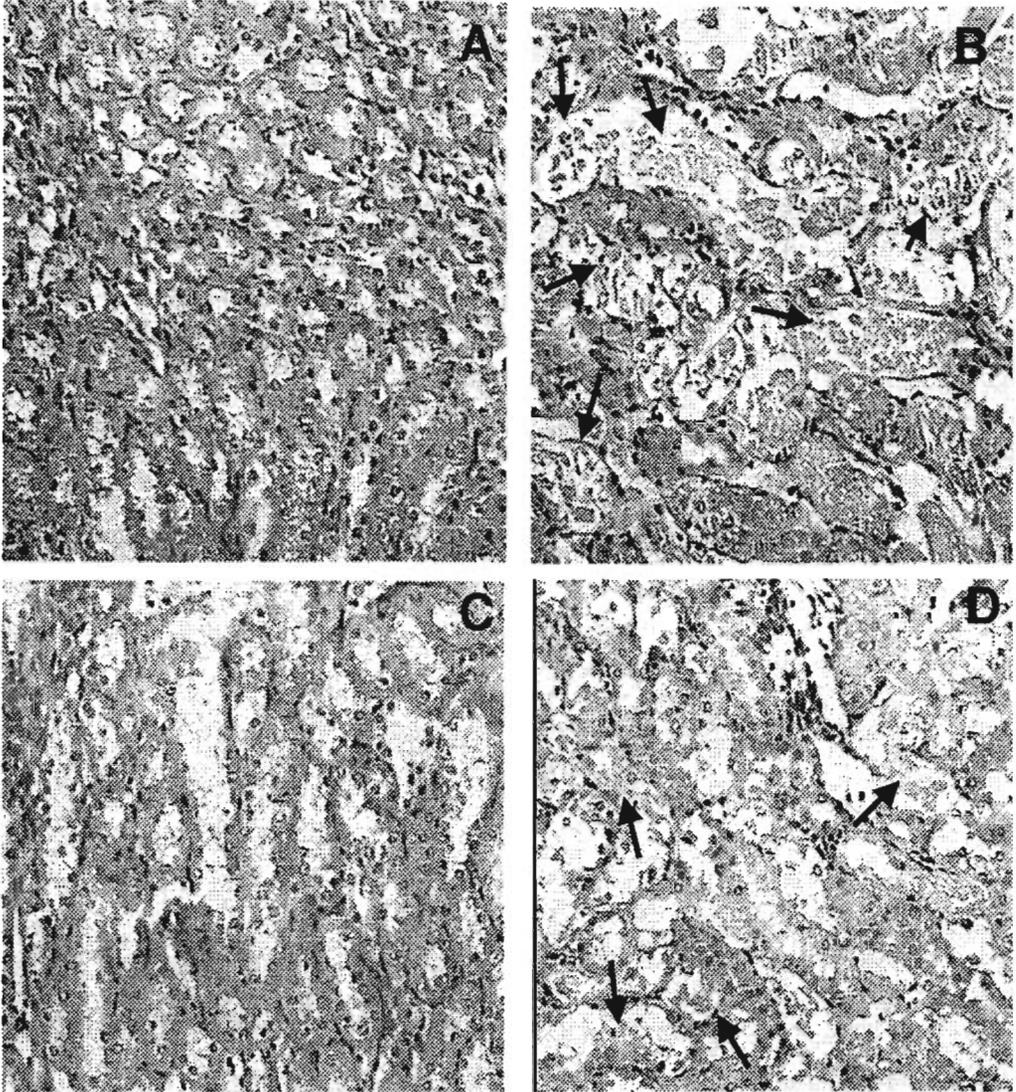


Figure 4
Representative histological abnormalities in the inner part of the cortical kidney after three days of cisplatin administration and their partial prevention by FeTPPS. (A) Normal kidney histology from control rat. (B) After three days of cisplatin administration, the straight portion of many cortical tubules are revisited by necrotic cells (arrows). (C) FeTPPS administration does not produce histological abnormalities. (D) The administration of FeTPPS partially prevents the cytotoxic damage induced by cisplatin; arrows indicate tubules with focal necrotic cells.

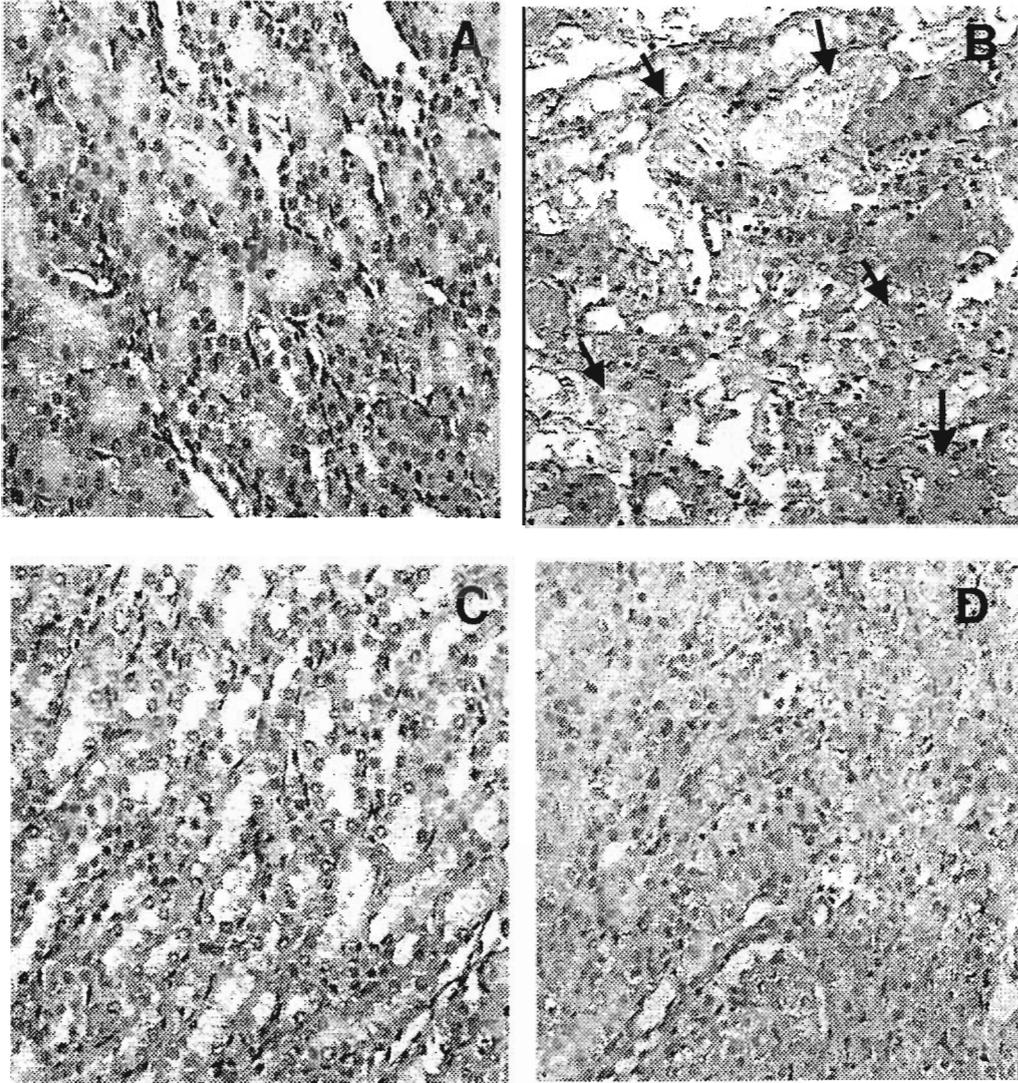


Figure 5
Nitrotyrosine (3-NT) expression determined by immunohistochemistry in the inner part of the cortical kidney after three days of cisplatin administration and its partial prevention by FeTPPS. (A) There is no 3-NT immunostaining in the kidney of control rat. (B) In contrast, three days after cisplatin administration there is a strong 3-NT expression in the necrotic cells from the straight portion of the proximal convoluted tubules (arrows). (C) FeTPPS administration does not induce 3-NT expression. (D) The administration of FeTPPS strongly decreases 3-NT expression induced by cisplatin-treatment (Cis+FeTPPS group).

induced by cisplatin [14]. In contrast, Mansour *et al.* [15] and Li *et al.* [16] have found that L-NAME administration resulted in no protection and Saad *et al.* [17] found that this NOS inhibitor aggravates cisplatin-induced renal dysfunction. These data may suggest that *NO is not playing a toxic role in cisplatin-induced nephrotoxicity. The above mentioned disagreement justify the performance of additional experiments to clarify the role of NOS and *NO in cisplatin-induced nephrotoxicity.

On the other hand, *NO is able to react with $O_2^{\cdot-}$ to produce ONOO \cdot , which is a powerful oxidant more reactive than its precursors, and has been implicated in an increasing list of diseases: hyperlipidemia [32], Alzheimer [20], acute renal ischemia [25], neurotoxicity induced by methamphetamine [33], and diabetes [23]. The ONOO \cdot decomposition catalyst FeTPPS is a water-soluble Fe (III) porphyrin complex able to block ONOO \cdot toxicity [28,29] and to protect against toxic insults in several experimental models. In focal cerebral ischemia-reperfusion in rats, massive production of *NO and $O_2^{\cdot-}$ results in continuous formation of ONOO \cdot even several hours after ischemia-reperfusion insult [34]. Significant reduction of 3-NT in brain sections and prominent neuroprotection was observed by FeTPPS (30 mg/kg) [34]. In a model of sepsis induced by injection of endotoxin (10 mg/kg) in rats, FeTPPS prevented the accumulation of ONOO \cdot as measured by plasma rhodamine fluorescence and heart 3-NT staining [35]. Interestingly, FeTPPS improved endotoxin-induced myocardial contractile dysfunction, which was associated with reduced degradation of nuclear factor kappa B inhibitory protein I-kappa-B, plasma TNF-alpha levels, and microvascular endothelial cell-leukocyte activation [35].

In this work it was found that FeTPPS partially prevented the increase in BUN and serum creatinine (markers of glomerular damage) and urinary excretion of NAG and total protein (markers of tubular damage) induced by cisplatin-treatment. The increase in urinary NAG and total protein excretion could be associated with necrosis of the proximal convoluted tubules, the primary site of drug accumulation [1]. FeTPPS prevented these alterations induced by cisplatin. This may be secondary to the ability of FeTPPS to catalyze the decomposition of ONOO \cdot which could be responsible, at least in part, of the alterations induced by cisplatin. This ameliorative effect of FeTPPS was associated with the decrease in 3-NT staining suggesting that ONOO \cdot is involved in protein nitration in cisplatin-nephrotoxicity. It is known that another RNS such as N_2O_4 , HONOO, *NO $_2$ [36], and nitryl chloride (NO $_2$ Cl) [37], are involved in protein nitration. Nitryl chloride is formed by the reaction of NO $_2^{\cdot}$ and HOCl-derived myeloperoxidase [37].

Studies in animals have established that tubular injury plays a central role in the reduction of glomerular filtration rate in acute tubular necrosis. Two major tubular abnormalities could be involved in the decrease in glomerular function in cisplatin-treated rats: obstruction and backleak of glomerular filtrate. The alteration in glomerular function can not be attributed to structural damage since glomeruli structure is normal in cisplatin-treated rats. The alterations in glomerular function in cisplatin-treated rats may also be secondary to ROS [38] which induce mesangial cells contraction, altering the filtration surface area and modifying the ultrafiltration coefficient, factors that decrease the glomerular filtration rate. In addition our data suggest that ONOO \cdot may also be involved in the glomerular alterations in cisplatin-treated rats.

The increase in renal ONOO \cdot induced by cisplatin may be secondary to the increase in *NO and $O_2^{\cdot-}$ production. In fact, there are evidences of the renal increase in *NO production in cisplatin nephrotoxicity [18,19] and $O_2^{\cdot-}$ generation in cisplatin-treated LLC-PK1 cells [30]. The $O_2^{\cdot-}$ increase in cisplatin-nephrotoxicity may be simply consequence of the mitochondrial dysfunction [39] and the decrease in superoxide dismutase activity [5].

Conclusions

Nitrosative stress is involved in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. The ameliorative effect of FeTPPS on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats was associated with the decrease in protein nitration suggesting that ONOO \cdot is involved in both protein nitration and nephrotoxicity in these animals.

Methods

Reagents

Cisplatin (catalogue # P-4394) was from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). FeTPPS (catalogue # 341492) was from (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Rabbit anti-3-NT polyclonal antibodies (Catalogue # 06-284) were from Upstate (Lake Placid, NY, USA). Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase antibodies (Catalogue # SAB-300) were purchased from Stressgen (Victoria BC, Canada). Commercial kits to measure creatinine and urea were from Spinreact (Girona, Spain). All other chemicals were reagent grade and commercially available.

Experimental design

Male Wistar rats (Harlan Teklad, Mexico City, Mexico) initially weighing 200–250 g were used. Experimental work was approved by DGAPA (IN227103) and followed the guidelines of Norma Oficial Mexicana (NOM-ECOL-087-1995). All animals had free access to water and commercial rodent diet (Harlan Teklad, catalogue 2018S), and were randomly divided in four groups (n = 6 rats/group)

as follows: (1) CT, injected intraperitoneally (i.p.) with isotonic saline solution; (2) Cis, treated with a single dose of cisplatin (7.5 mg/Kg b.w./i.p.) [40]; (3) FeTPPS, treated with FeTPPS (15 mg/kg/i.p./12 h) [32] for 3 days; and (4) Cis+FeTPPS, treated with Cis and with FeTPPS. During the study rats were maintained with a 12-h light:dark cycle in stainless steel metabolic cages to collect urine. On day 3, the animals were sacrificed by decapitation and blood was collected to obtain serum and to measure creatinine and BUN. Total protein and NAG were measured in 24-h urine. The kidneys were removed to obtain cortex samples for histological and immunohistochemical studies.

Markers of glomerular and tubular damage

The markers of glomerular damage, creatinine and urea, were measured using commercial kits. BUN was obtained by correcting the urea value by a 2.14 factor [41]. As markers of tubular damage, we measured urinary excretion of NAG and total protein. NAG activity was measured using p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide as substrate and total protein was measured by a turbidimetric method [42].

Histological analysis

Thin slices of kidney tissue with cortex and medulla were fixed by immersion in buffered formalin (pH 7.4), dehydrated and embedded in paraffin [43]. Sections of 3 μ m were stained with hematoxylin and eosin. The histological profile of twenty proximal tubules randomly selected per rat (6 rats per experimental group) was recorded using a Leica Qwin Image Analyzer (Cambridge, England). The percentage of tubular area with histopathological alterations like swelling, cytoplasmic vacuolization, desquamation or necrosis was obtained. The percentage of damaged area of Cis and Cis+FeTPPS groups was compared.

Immunohistochemical localization of 3-nitro-L-tyrosine (3-NT)

For immunohistochemistry, 3 μ m sections were deparaffinized with xylol and rehydrated with ethanol. Endogenous peroxidase was quenched/inhibited with 4.5% H₂O₂ in methanol by incubation for 1.5 h at room temperature. Nonspecific adsorption was minimized by leaving the sections in 3% bovine serum albumin in phosphate buffer saline for 30 min. Sections were incubated overnight with a 1:700 dilution of anti-3-NT antibody. After extensive washing with phosphate buffer saline, the sections were incubated with a 1:1000 dilution of a peroxidase conjugated anti-rabbit Ig antibody for 1 h, and finally incubated with hydrogen peroxide-diaminobenzidine for 10 s. Sections were counterstained with hematoxylin and observed under light microscopy. All the sections from the four studied groups were incubated under the same conditions with the same antibodies concentration, and in the same

running, so the immunostaining was comparable among the different experimental groups [43].

Statistics

Results are expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. Non-paired t-test was used to compare the quantitative histological damage data using the software Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA). P \leq 0.05 was considered statistically significant.

Authors' contributions

YICH performed animal experimentation, biochemical determinations, statistical analyses, light microscopy and immunohistochemical studies. RHP supported the light microscopy and immunohistochemical studies. JPC conceived, designed and coordinated the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA (IN227103 and IX203504).

References

- Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H: Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997, 12:2478-2480.
- Inselmann G, Blomer A, Kottny W, Nellesen U, Hanel H, Heidemann HT: Modification of cisplatin-induced renal p-aminohippurate uptake alteration and lipid peroxidation by thiol, Ginkgo biloba extract, deferoxamine and torbafylline. *Nephron* 1995, 70:425-429.
- Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S: The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2004, 50:287-290.
- Davis CA, Nick HS, Agarwal A: Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: Importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12:2683-2690.
- Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y: The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol* 2004, 23:29-34.
- Shino Y, Itoh Y, Kubota T, Yano T, Sendo T, Oishi R: Role of poly(ADP-ribose)polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med* 2003, 35:966-977.
- Husain K, Morris C, Whitworth C, Trammell GL, Rybak LP, Somani SM: Protection by ebselen against cisplatin-induced nephrotoxicity: antioxidant system. *Mol Cell Biochem* 1998, 178:127-133.
- Suelishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H, Oishi R: Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 2002, 451:203-208.
- Sener G, Satioglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F, Keyerlysa M: The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2000, 14:553-560.
- Wejli NI, Eisendoorn TJ, Lenjens EG, Hopman GD, Wipkin-Bakker A, Zwinderman AH, Cleon FJ, Osanto S: Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Cancer* 2004, 40:1713-1723.
- Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A: Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000, 278:F726-F736.
- Agarwal A, Nick HS: Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 Gene ablation and expression. *J Am Soc Nephrol* 2000, 11:965-973.

13. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA: **Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002, 132:123-128.
14. Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, Misra M, Hasan SK, Husain MM: **Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats.** *Biometals* 1996, 9:139-142.
15. Mansour MA, Al-Shabanah OA, El-Khashef HA: **L-arginine ameliorates kidney function and urinary bladder sensitivity in experimentally-induced renal dysfunction in rats.** *J Biochem Mol Biol* 2003, 36:373-378.
16. Li Q, Bowmer CJ, Yates MS: **The protective effect of glycine in cisplatin nephrotoxicity: inhibition with NG-nitro-L-arginine methyl ester.** *J Pharm Pharmacol* 1994, 46:346-351.
17. Saad SY, Najjar TA, Daba MH, Al-Rikabi AC: **Inhibition of nitric oxide synthase aggravates cisplatin-induced nephrotoxicity effect of 2-amino-4-methylpyridine.** *Chemotherapy* 2002, 48:309-315.
18. Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, Akyol O: **Oral erdoesteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats.** *Pharmacol Res* 2003, 47:149-156.
19. Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sogut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z: **Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats.** *J Appl Toxicol* 2004, 24:27-35.
20. Castagna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA: **Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain.** *J Neurochem* 2003, 85:1394-1401.
21. Luth HJ, Munch G, Arendt T: **Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation.** *Brain Res* 2002, 953:135-143.
22. Mabley JG, Llaudet L, Pacher P, Southan GJ, Salzman AL, Szabo C: **Part II: beneficial effects of the peroxynitrite decomposition catalyst FP15 in murine models of arthritis and colitis.** *Mol Med* 2002, 8:581-590.
23. Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT: **Part I: pathogenic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst.** *Mol Med* 2002, 8:571-580.
24. Yokozawa T, Rhyu DY, Cho EJ: **Protection by the Chinese prescription Wen-Pi-Tang against renal tubular LLC-PK1 cell damage induced by 3-morpholinopyridone.** *J Pharm Pharmacol* 2003, 55:1405-1412.
25. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky J: **Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2001, 281:F948-F957.
26. Alvarez B, Radi R: **Peroxyntirite reactivity with amino acids and proteins.** *Amino Acids* 2003, 25:295-311.
27. Szabo C: **Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity.** *Toxicol Lett* 2003, 140-141:105-112.
28. Jensen M, Riley D: **Peroxyntirite decomposition activity of iron porphyrin complexes.** *Inorg Chem* 2002, 41:4788-4797.
29. Misko TP, Highkin MK, Veenhuizen AV, Manning PT, Stern MK, Currie MG, Salvemini D: **Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts.** *J Biol Chem* 1998, 273:15646-15653.
30. Baik SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK: **Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells.** *J Lab Clin Med* 2003, 142:178-186.
31. Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO: **Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats.** *Toxicology* 2004, 195:221-230.
32. Onody A, Csonka C, Girtz Z, Ferdinandy P: **Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet leads to enhanced peroxynitrite formation in rat hearts.** *Cardiovasc Res* 2003, 58:663-670.
33. Imam SZ, Islam F, Itzhak Y, Slikker W Jr, Ali SF: **Prevention of dopaminergic neurotoxicity by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the prevention of methamphetamine-induced neurotoxic damage.** *Ann N Y Acad Sci* 2000, 914:157-171.
34. Thyagarajan M, Kaul CL, Sharma SS: **Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats.** *Br J Pharmacol* 2004, 142:899-911.
35. Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R: **Peroxyntirite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats.** *J Am Coll Cardiol* 2004, 43:2348-2358.
36. Eberhardt M: **Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences.** Boca Raton: CRC Press LLC; 2001.
37. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A: **Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils.** *Nature* 1998, 391:393-397.
38. Duque I, Garcia-Escribano C, Rodriguez-Puyol M, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodriguez-Puyol D: **Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli.** *Am J Physiol* 1992, 263:F466-F473.
39. Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF: **Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain.** *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 280:638-649.
40. Al-Majed AA, Abd-Allah AR, Al-Rikabi AC, Al-Shabanah OA, Mostafa AM: **Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats.** *J Biochem Mol Toxicol* 2003, 17:146-153.
41. Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macias-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernandez-Pando R: **S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo.** *BMC Clin Pharmacol* 2004, 4:5.
42. Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J: **Antioxidant S-allyl-cysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage.** *Free Radic Biol Med* 2003, 35:317-324.
43. Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J: **HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K2Cr2O7.** *Free Radic Biol Med* 2003, 34:1390-1398.

Publish with **Bio Med Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

