

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS.

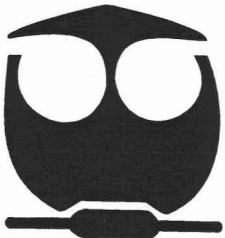
EXPRESION Y PAPEL FUNCIONAL DE LA
HEMO OXIGENASA-1 EN LA NEFROTOXICIDAD
INDUCIDA POR D-SERINA.

T E S I S

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

P R E S E N T A :
Q. A. MARISOL OROZCO IBARRA

TUTOR: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI



MEXICO, D. F.

2005

m 346946



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis de maestría se realizó en el laboratorio 209 del edificio B de la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección del Dr. José Pedraza Chaverri. El proyecto fue apoyado por DGAPA (Claves No. IN227103 y No. IX203504).

El comité tutorial que asesoró este trabajo estuvo conformado por los siguientes investigadores:

Dr. José Pedraza Chaverri (Facultad de Química, UNAM).

Dra. Lourdes Massieu Trigo (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Dr. Mauricio Díaz Muñoz (Instituto de Neurobiología, UNAM).

El jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Bioquímicas), estuvo conformado por los siguientes investigadores:

PRESIDENTE Dr. Jorge Vázquez Ramos.

VOCAL Dra. Norma Bobadilla Sandoval.

SECRETARIO Dra. Lourdes Massieu Trigo.

SUPLENTE Dr. Rolando E. Hernández Muñoz.

SUPLENTE Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

La paciencia es un árbol de raíces amargas pero de frutos dulces. Proverbio persa

En la pugna entre el arroyo y la roca, siempre triunfa el arroyo... no porque sea muy fuerte, sino porque persevera.

H Jackson Brown

La peor derrota de una persona es cuando pierde su entusiasmo. HW Arnold

No son los golpes ni las caídas las que hacen fracasar al hombre, sino su falta de voluntad para levantarse y seguir adelante. Anónimo

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

NOMBRE: Marisol Orozco

Ibarra

FECHA: 18-08-05

FIRMA: [Firma]

CONTENIDO

<u>RESUMEN</u>	1
<u>ANTECEDENTES</u>	3
1. <u>ESTRÉS OXIDATIVO</u>	
1.1 <u>Definición</u>	3
1.2 <u>Especies reactivas de oxígeno (ERO)</u>	3
1.2.1 <u>Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)</u>	4
1.2.2 <u>Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)</u>	4
1.2.3 <u>Radical hidroxilo ($OH\cdot$)</u>	5
1.2.4 <u>Otras ERO</u>	5
1.2.5 <u>Grupo Hemo: Prooxidante</u>	5
1.3 <u>Mecanismos de defensa antioxidante</u>	6
1.3.1 <u>Antioxidantes enzimáticos</u>	7
1.3.1.1 <u>Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)</u>	7
1.3.1.2 <u>Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)</u>	7
1.3.1.3 <u>Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)</u>	7
1.3.1.4 <u>Glutación reductasa (GSH-Rx) (EC 1.6.4.2)</u>	8
1.3.2 <u>Antioxidantes no enzimáticos</u>	8
1.3.2.1 <u>Antioxidantes no enzimáticos endógenos</u>	9
1.3.2.1.1 <u>Glutación</u>	9
1.3.2.1.2 <u>Ácido úrico</u>	9
1.3.2.1.3 <u>Bilirrubina</u>	9
1.3.2.2 <u>Antioxidantes no enzimáticos exógenos</u>	10
1.3.2.2.1 <u>Vitamina E (α-tocoferol)</u>	10
1.3.2.2.2 <u>Vitamina C (ácido ascórbico)</u>	10
1.3.2.2.3 <u>Carotenoides</u>	10
2. <u>Riñón</u>	11
2.1 <u>Descripción y estructura</u>	11
2.2 <u>ERO, enzimas antioxidantes y riñón</u>	12

3. <u>HEMO OXIGENASA (HO)</u>	13
3.1 <u>Hemo oxigenasa 1 (HO-1)</u>	14
3.1.1 <u>Estrés oxidativo y HO-1</u>	15
3.1.2 <u>Papel de la expresión de la HO-1 en el daño renal</u>	15
3.2 <u>Inducción e inhibición de HO-1 por agentes químicos</u>	17
4. <u>NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR D-SERINA</u>	18
4.1 <u>Descripción y estructura química de la D-serina</u>	18
4.1.1 <u>Uso terapéutico de la D-serina</u>	19
4.2 <u>Metabolismo de la D-serina</u>	19
4.2.1 <u>Serina racemasa</u>	19
4.2.2 <u>Oxidasa de D-aminoácidos</u>	20
4.3 <u>Daño renal inducido por D-serina</u>	20
4.4 <u>Estrés oxidativo y nefrotoxicidad inducida por D-serina</u>	22
<u>JUSTIFICACIÓN</u>	23
<u>HIPÓTESIS</u>	23
<u>OBJETIVOS</u>	23
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	24
1. <u>Reactivos y equipo</u>	24
2. <u>Animales y estrategia experimental</u>	24
2.1 <u>Tratamiento de los animales y obtención de muestras</u>	24
2.2 <u>Tratamiento de las muestras</u>	27
3. <u>Determinaciones</u>	28
3.1 <u>Evaluación de insuficiencia renal</u>	28
3.1.1 <u>Disfunción glomerular</u>	28
3.1.1.1 <u>Nitrógeno de urea en sangre (BUN)</u>	28

3.1.1.2 <u>Creatinina y depuración de creatinina</u>	28
3.1.2 <u>Disfunción tubular</u>	29
3.1.2.1 <u>Proteinuria</u>	29
3.1.2.2 <u>Glucosuria</u>	29
3.1.2.3 <u>Actividad de NAG en orina</u>	30
3.1.2.4 <u>Reabsorción tubular de agua</u>	30
3.2 <u>Evaluación de la HO-1</u>	31
3.3 <u>Evaluación del daño oxidativo y sistema antioxidante</u>	31
3.3.1 <u>Lipoperoxidación</u>	31
3.3.2 <u>Proteínas oxidadas</u>	32
3.3.4 <u>Western blot de Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y catalasa</u>	32
3.3.5 <u>Actividad enzimática de SOD total</u>	33
3.3.6 <u>Actividad enzimática de catalasa</u>	33
3.3.7 <u>Actividad enzimática de GSH-Rx</u>	34
3.3.8 <u>Actividad enzimática de GPx</u>	34
3.3.9 <u>Determinación de GSHeq y GSSG</u>	35
3.3.10 <u>Producción de nitritos y nitratos</u>	36
4. <u>Análisis estadístico</u>	36
<u>RESULTADOS</u>	37
<u>Esquema 1</u>	41
<u>Esquema 2</u>	37
<u>Esquema 3</u>	45
<u>DISCUSIÓN</u>	49
<u>CONCLUSIONES</u>	53
<u>PERSPECTIVAS</u>	53
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	54

RESUMEN

ANTÉCEDENTES. La hemo oxigenasa (HO) cataliza el paso que controla la velocidad de la degradación del grupo hemo, produciendo monóxido de carbono, hierro y biliverdina; esta última es transformada subsecuentemente a bilirrubina por la biliverdina reductasa. Ambas reacciones son dependientes de NADPH. Se conocen tres isoenzimas genéticamente distintas, HO-1, HO-2 y HO-3. Las dos últimas son muy similares entre sí (90% de identidad) y con HO-1 tienen una identidad en secuencia de aminoácidos y de nucleótidos cercana a 43%. La HO-1 es inducida intensamente por su sustrato, el grupo hemo, y por numerosos estímulos, tales como luz UV, metales pesados e hiperoxia.

El papel funcional exacto de la inducción de HO-1 en la respuesta al estrés oxidativo no está completamente claro. Se considera que la activación del gen de HO-1 es un mecanismo de defensa celular adaptativo debido a que esta enzima confiere citoprotección en varias líneas celulares así como en modelos animales bajo estrés oxidativo. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de HO-1 atenúa los efectos tóxicos del grupo hemo en células endoteliales, y confiere protección renal en la nefrotoxicidad por dicromato de potasio. En el siglo pasado se observó que la administración de D-serina induce nefrotoxicidad. Aunque no se sabe con exactitud cuál es el mecanismo de daño renal, aunque se ha postulado que el estrés oxidativo podría estar involucrado. Considerando todo lo anterior, es posible que la HO-1 confiera protección en la insuficiencia renal inducida por D-serina.

HIPÓTESIS. Si el estrés oxidativo se encuentra implicado en el la nefrotoxicidad inducida por D-serina, se esperaría que la HO-1 se exprese después de la administración de este aminoácido. Además, se esperaría que la sobreexpresión de la HO-1 atenúe y su inhibición exacerbe la nefrotoxicidad por D-serina.

OBJETIVO. Estudiar la expresión y el papel funcional de la HO-1 en la nefrotoxicidad inducida por D-serina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. Se trabajó con ratas a las que se administró: i) D-serina e inductor de HO-1 (SnCl_2), ii) D-serina, inductor (SnCl_2) e inhibidor de HO-1 (mesoporfirina de estaño), iii) D-serina o iv) L-serina (control), con el fin de evaluar si la sobreexpresión de la HO-1 previene la insuficiencia renal inducida por D-serina, y si su inhibición exacerba la insuficiencia renal inducida por dicho aminoácido.

METODOLOGÍA. La cantidad de HO-1 se evaluó mediante Western blot. Se determinaron parámetros de insuficiencia renal: proteinuria, glucosuria, creatinina en suero, reabsorción tubular de agua, actividad de N-acetil- β -glucosaminidasa en orina y nitrógeno de urea en sangre. Además, el daño oxidativo se evaluó mediante la determinación de lipoperoxidación y proteínas oxidadas. También se midió la expresión y/o actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

RESULTADOS. La administración de D-serina ocasiona insuficiencia renal, pero no induce la HO-1. La administración de SnCl₂ y/o SnMP no modifica la nefrotoxicidad por D-serina, sugiriendo que la HO-1 no participa en la nefrotoxicidad inducida por D-serina. Aunado a esto, se encontró que el estrés oxidativo no parece estar involucrado en la insuficiencia renal inducida por D-serina, ya que este aminoácido no indujo un aumento en los marcadores de daño oxidativo estudiados, como son la lipoperoxidación y las proteínas oxidadas. Además, la actividad y la expresión de las enzimas antioxidantes estudiadas no se modificaron.

CONCLUSIONES. En las condiciones estudiadas, la HO-1 no tiene un papel citoprotector sobre la nefrotoxicidad inducida por D-serina, y la insuficiencia renal por D-serina no parece estar asociada al estrés oxidativo.

PERSPECTIVAS. Investigar respecto al mecanismo de nefrotoxicidad por D-serina si se modifican los marcadores de estrés oxidativo en tiempos mayores de exposición al aminoácido y si hay evidencia de estrés nitrosativo.

ANTECEDENTES

1 ESTRÉS OXIDATIVO

1.1 Definición

Las células de organismos aerobios producen continuamente radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) como parte de sus procesos metabólicos; estas ERO son neutralizadas por un elaborado sistema de defensas antioxidantes que consiste en enzimas tales como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y numerosos antioxidantes no enzimáticos, que incluyen vitaminas, glutatión y flavonoides (Urso y Clarkson, 2003).

El estrés oxidativo es un estado en el que se encuentra alterado el equilibrio de óxido-reducción celular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una producción excesiva de ERO, por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, o por ambas cosas, conduciendo a daño celular (Evans y Halliwell, 2001).

1.2 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

En la cadena respiratoria mitocondrial, el oxígeno se reduce completamente al aceptar 4 electrones en el complejo citocromo oxidasa, formándose agua como producto final. La generación de ERO ocurre cuando esta reducción de oxígeno es incompleta (Fig. 1), formándose principalmente tres especies: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Se considera que aproximadamente el 3% de los electrones provenientes de NADH, se desvían hacia la formación de ERO por reducción incompleta del oxígeno.

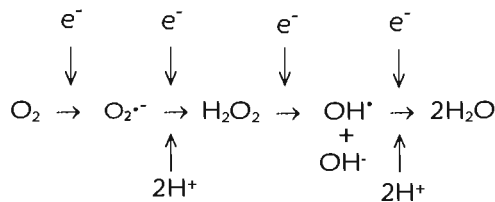


Fig. 1. Reducción univalente del oxígeno

Las ERO oxidan macromoléculas biológicas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Olinescu y Smith, 2002).

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

El anión superóxido se forma cuando el oxígeno gana un electrón. En condiciones fisiológicas se produce en bajas concentraciones por el metabolismo celular a partir de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, en reacciones de la enzima xantina oxidasa o durante los procesos fagocíticos de las células de defensa inmunológica, a través de un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa (Fig. 2) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

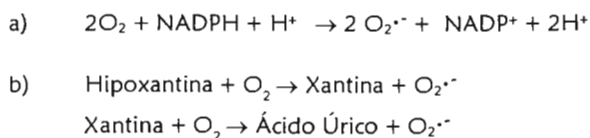


Fig. 2. Producción de $O_2^{\cdot-}$ mediante las reacciones catalizadas por a) NADPH oxidasa, y b) Xantina oxidasa

Esta especie reactiva no ataca directamente al DNA, proteínas o lípidos, pero a niveles elevados puede movilizar pequeñas cantidades de Fe^{3+} desde la ferritina de la siguiente manera (Halliwell, 2001):



El $O_2^{\cdot-}$ también puede atacar los sitios activos de algunas enzimas que contienen centros Fe-S, como la aconitasa, causando su inactivación y liberación de Fe^{2+} .

1.2.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 se forma en los organismos durante las reacciones de oxidación de quinonas, oxidación de compuestos que contienen grupos sulfhidrilos y mediante la dismutación del anión superóxido por la acción de la enzima superóxido dismutasa (Fig. 3). Sin embargo, la fuente más importante de formación del H_2O_2 en las células es la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Este compuesto no es un radical libre ya que tiene todos sus electrones apareados, así que es un agente oxidante poco reactivo; sin embargo, puede reaccionar con iones como el hierro y el cobre en la reacción de Fenton, dando lugar a la formación del radical hidroxilo (Halliwell, 2001).

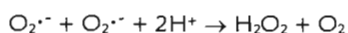


Fig. 3. Formación de H_2O_2

1.2.3 Radical hidroxilo (OH[•])

El radical hidroxilo se produce *in vivo* por las reacciones de Fenton y Haber-Weiss principalmente (Fig. 4). Es una molécula muy reactiva y su producción es crítica ya que reacciona con todas las macromoléculas del organismo: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las células no poseen mecanismos antioxidantes que puedan combatirlo, por lo que tienen como estrategia prevenir su formación eliminando sus precursores (O₂^{•-} y H₂O₂) mediante el sistema de defensa antioxidante.

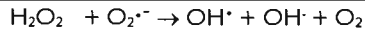
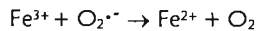
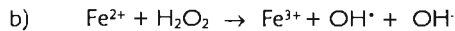
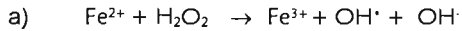


Fig. 4. a) Reacción de Fenton, y b) Reacción de Haber-Weiss

1.2.4 Otras ERO

Existen otras ERO, entre las que se encuentran el oxígeno singulete (¹O₂) y el hipoclorito (en su forma no protonada ClO[•] o protonada HOCl, también llamado ácido hipocloroso). Este último se forma a partir de H₂O₂ en la reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa. Por su parte, el ¹O₂ es una forma excitada de la molécula de oxígeno diatómico, que puede originarse por transferencia de energía desde otra molécula reactiva (Fig. 5) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

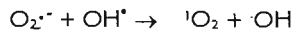
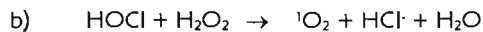
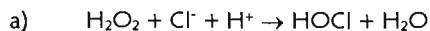


Fig. 5. Formación de a) HOCl por la mieloperoxidasa, y b) singulete de oxígeno.

1.2.5 Grupo hemo: Prooxidante

Además de las ERO, en las células también existen moléculas prooxidantes, entre las que se encuentra el grupo hemo. Éste es un complejo de Fe²⁺ con protoporfirina IX, esencial para la función de las células aerobias (Fig. 6). Sirve como grupo prostético de numerosas hemoproteínas con funciones biológicas diversas, tales como hemoglobina y mioglobina (transporte de oxígeno), citocromos (transferencia de electrones), oxidasas, peroxidasas y catalasas (metabolismo del oxígeno).

Sus niveles celulares están fuertemente controlados, lo cual se logra mediante un fino balance entre su biosíntesis y catabolismo. Los requerimientos de hemo varían significativamente entre los diferentes tejidos: las mayores velocidades de biosíntesis se registran en eritrocitos e hígado (Ponka, 1999).

Cuando se encuentra libre en altas concentraciones, el grupo hemo es un prooxidante lipofílico que promueve la lipoperoxidación de las membranas lipídicas y organelos tales como mitocondrias y núcleo, también desestabiliza el citoesqueleto y proteínas asociadas a membrana, con lo que compromete la estructura y el transporte (Wagener et al., 2003). Además, interfiere con la actividad de enzimas citosólicas y mitocondriales y activa enzimas proteolíticas y lisosomas. En experimentos *in vitro*, se ha demostrado que el grupo hemo es capaz de oxidar al DNA. Por otra parte, hay observaciones clínicas como prueba de su marcada nefrotoxicidad cuando se administra en dosis elevadas a pacientes con la enfermedad de las porfirias (Dhar et al., 1978).

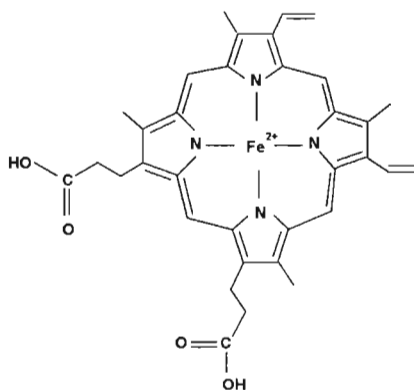


Fig. 6. Estructura química del grupo hemo

1.3 Mecanismos de defensa antioxidante

Las acciones de las ERO y las moléculas prooxidantes son contrarrestadas *in vivo* por un sistema de defensa antioxidante (Halliwell, 2001). Así, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa que impiden la formación de ERO, o reaccionan con ellas para convertirlas en especies menos reactivas. Estos sistemas de defensa se pueden clasificar en dos tipos: antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa -SOD-, catalasa -CAT-, glutatión peroxidasa -GPx-, glutatión reductasa -GSH-Rx- y hemo oxigenasa -HO1-, entre otros) y antioxidantes no enzimáticos (glutatión, ácido úrico, bilirrubina, vitaminas E y C y carotenoides, entre otros).

1.3.1 Antioxidantes enzimáticos

1.3.1.1 Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

Es una metaloenzima que lleva a cabo la reacción de dismutación del anión superóxido a oxígeno y H_2O_2 (Fig. 3). La actividad de la SOD es independiente del pH, además esta enzima tiene una alta afinidad por su sustrato, es resistente al calor y a compuestos desnaturizantes como la urea. En los mamíferos hay tres isoformas: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y SOD-EC. Las tres se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos y son productos de genes diferentes. Dos de estas isoformas poseen en su sitio activo Cu y Zn; una de ellas se localiza en el citosol y la otra es extracelular; la tercera isoforma tiene en su sitio activo Mn y se localiza en la matriz mitocondrial (Matés *et al.*, 1999).

La SOD no es propiamente una enzima antioxidante, ya que el producto de su actividad es el H_2O_2 , que también causa daño celular. Sin embargo, se le considera como tal ya que la reacción que cataliza es solo el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación de las ERO. El siguiente paso depende de la enzima catalasa.

1.3.1.2 Catalasa (E.C.1.11.1.6)

La catalasa es la enzima que descompone el H_2O_2 en oxígeno y agua (Fig. 7). Es una hemoproteína tetramérica con peso molecular de 240 kDa; su vida media en circulación es relativamente corta, de 6 a 8 min. Se localiza principalmente en peroxisomas (80%) y mitocondria. En mamíferos, la catalasa está presente en altas concentraciones en hígado y riñón y en bajos niveles en tejido conectivo (Matés *et al.*, 1999). Además de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la peroxidasa de leucocitos compiten por el H_2O_2 como sustrato, razón por la cual no hay un aparente efecto dañino por la deficiencia de la enzima.

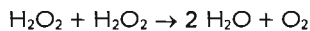


Fig. 7. Reacción catalizada por la catalasa

1.3.1.3 Glutatión peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)

Esta enzima cataliza la descomposición de H_2O_2 o de otros peróxidos orgánicos mediante la oxidación del glutatión reducido -GSH- a glutatión oxidado -GSSG- (Fig. 8). El GSSG es a su vez reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa (GSH-Rx) en presencia de NADPH, formando un ciclo redox impidiendo que se agote la reserva celular de GSH (Matés *et al.*, 1999).

Esta enzima contiene un átomo de selenio en su sitio activo y se conocen al menos 4 isoformas (Kuhn y Borchert, 2002):

- GPx citosólica (cGPx, GPx-1): Tetrámero de 88 kDa, sólo tiene actividad si se incrementan H₂O₂ e hidroperóxidos de ácidos grasos; muestra una baja actividad sobre hidroperóxidos de fosfolípidos.
- GPx de suero (pGPx, GPx-3): Tetrámero de 100 kDa, se sintetiza principalmente en el riñón. Se considera un marcador de daño al túbulo proximal, ya que su actividad plasmática disminuye durante la necrosis tubular aguda.
- GPx gastrointestinal (giGPx, GPOx-2): Tetrámero de 88 kDa. En roedores se localiza en el tracto gastrointestinal principalmente, y en el humano se ha encontrado también en hígado. Se piensa que tiene un efecto protector contra los efectos adversos de los hidroperóxidos.
- GPx de fosfolípidos (phGPx, GPx-4): Monómero de 19 kDa. Es una hidropoxidasa de fosfolípidos unida a membranas intracelulares y tiene una afinidad menor por GSH.

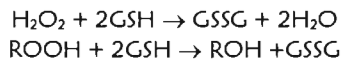


Fig. 8. Reacciones de la GPx

1.3.1.4 Glutati6n reductasa (GSH-Rx) (EC 1.6.4.2)

Es una enzima que requiere NADPH para catalizar la conversi6n de GSSG a GSH (Fig. 9). Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de GSH, el cual posee diversas propiedades redox.

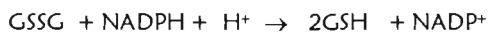


Fig. 9. Reacci6n de la GSH-Rx

1.3.2 Antioxidantes no enzimáticos

El sistema de defensa antioxidante tambi6n incluye compuestos de bajo peso molecular, que son sintetizados *in vivo* (end6genos) o bien, se obtienen de los alimentos (ex6genos). Algunos de los que pertenecen al primer grupo son: GSH, 6cido 6rico y bilirrubina. En el segundo grupo se puede contar a las vitaminas E y C, y carotenoides, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 1999).

1.3.2.1 Antioxidantes no enzimáticos endógenos

1.3.2.1.1 Glutatión (GSH)

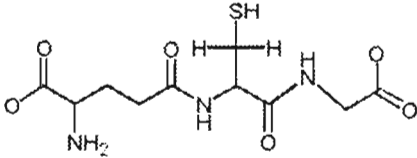


Fig. 10. Estructura química del glutatión

El GSH es un tripéptido (Fig. 10) de ácido glutámico, cisteína y glicina (L- α -glutamil-L-cisteinil-glicina), es soluble en agua y fue descubierto en 1888. Es una molécula involucrada en múltiples procesos y reacciones, que al poseer un grupo sulfhidrilo libre, sirve como antioxidante al ser susceptible de reaccionar con radicales libres o ERO. Además, es cofactor de enzimas como la GPx. Su producción es abundante en el riñón (Olinescu y Smith, 2002). El cambio en el cociente GSH/GSSG se utiliza frecuentemente como marcador de estrés oxidativo.

1.3.2.1.2 Ácido úrico

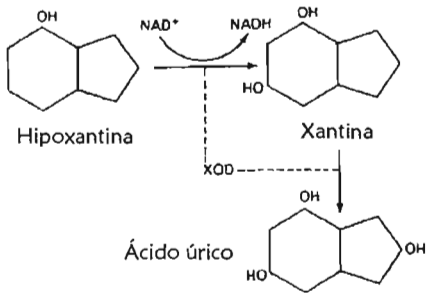


Fig. 11. Producción de ácido úrico

El ácido úrico se produce durante la oxidación de hipoxantina y xantina por la enzima xantina oxidasa (XOD, Fig. 11) (Halliwell y Gutteridge, 1999), está presente en suero. Se ha demostrado que aumenta la capacidad antioxidante del suero y previene la formación de productos de lipoperoxidación durante el ejercicio (Waring *et al.*, 2003).

1.3.2.1.3 Bilirrubina

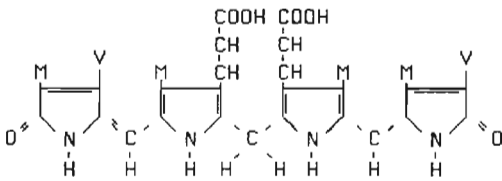


Fig. 12. Estructura química de la bilirrubina

La bilirrubina (Fig. 12) es el producto final de la degradación del grupo hemo en mamíferos. Es un compuesto amarillo brillante, insoluble en agua, capaz de unirse fuertemente a la albúmina. Se ha demostrado *in vitro*, que actúa sobre radicales peroxilo y $^1\text{O}_2$. *In vivo*,

confiere citoprotección en varios modelos asociados con el estrés oxidativo (Dudnik *et al.*, 2001).

1.3.2.2 Antioxidantes no enzimáticos exógenos

1.3.2.2.1 Vitamina E (α -tocoferol)

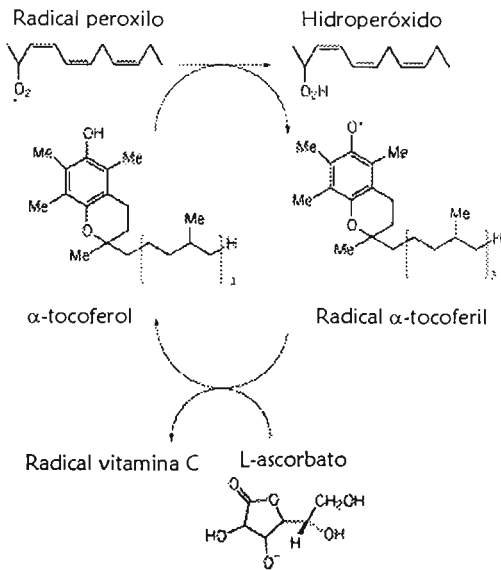


Fig. 13. Ciclo de regeneración de la Vit. E

1.3.2.2.2 Vitamina C (ácido ascórbico)

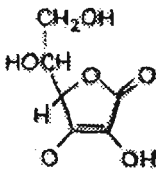


Fig. 14. Estructura química de la Vit. C

La vitamina E es un antioxidante liposoluble cuya función principal es mantener la integridad estructural de las membranas, al actuar sobre radicales lipídicos peróxido e hidroperóxido. Se concentra principalmente en corazón, testículos e hígado. Debido a que su acción antioxidante radica en donar sus propios electrones y oxidarse a radical α -tocoferilo, debe ser regenerado por otros antioxidantes, tales como glutatión y vitamina C (Fig. 13) (Olinescu y Smith, 2002). Se obtiene al ingerir aceites vegetales (algodón, girasol, trigo, cártamo), mantequilla y camarones.

La vitamina C (Fig. 14) es un antioxidante hidrosoluble que *in vitro* reacciona directamente con $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , y varios peróxidos lipídicos. Se ha encontrado en glándula pituitaria y en menor concentración en hígado, páncreas y cerebro (Olinescu y Smith, 2002); además, es la principal defensa antioxidante en plasma. También se ha encontrado que esta vitamina tiene efectos prooxidantes *in vitro* al reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , lo que posibilita las reacciones tipo Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999). Se obtiene principalmente de jugos de cítricos, fresa, tomate y brócoli.

1.3.2.2.3 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos coloridos (usualmente rojo, amarillo o naranja) distribuidos ampliamente en tejidos vegetales, por lo que se obtienen de alimentos de origen vegetal como zanahorias, chabacanos, mangos, calabaza, tomate, papaya y muchos más.

Pertenecen a este grupo químico la luteína, licopeno y β -caroteno (Fig. 15).

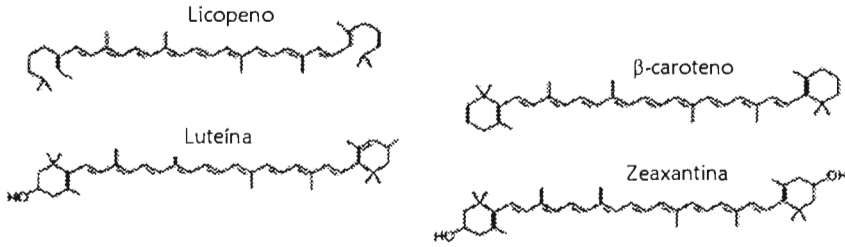


Fig. 15. Estructura química de algunos carotenoides

2. Riñón

2.1 Descripción y estructura

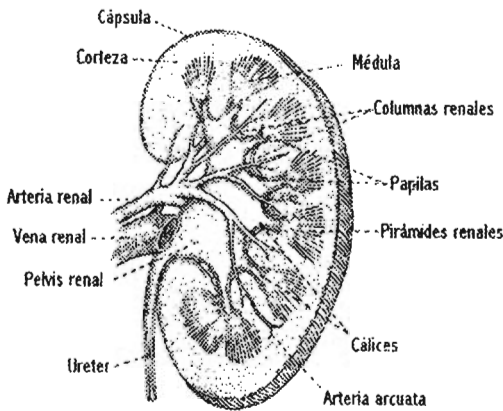


Fig. 16. Diagrama de un riñón seccionado longitudinalmente, se muestran las estructuras anatómicas principales.

Los riñones constituyen un órgano par, se sitúan a cada lado de la columna vertebral y están rodeados de tejido graso, la cápsula adiposa renal (Fig. 16). Presentan un borde externo convexo y un borde interno cóncavo. Este último ostenta un hueco denominado hilio, por donde entran y salen los vasos sanguíneos. En el lado anterior se localiza la vena renal que recoge la sangre del riñón, y en la parte posterior la arteria renal que lleva la sangre hacia los riñones. Más atrás se localiza el uréter, un tubo que conduce la orina hacia la vejiga. El hilio nace de una

cavidad más profunda, el seno renal, donde el uréter se ensancha formando un pequeño saco denominado pelvis renal (Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

El riñón se divide macroscópicamente en dos regiones, la corteza y la médula renal. Ambas regiones se caracterizan por la presencia de estructuras específicas: en la corteza se ubican los corpúsculos renales (glomérulo + cápsula de Bowman) y las porciones contorneadas proximales y distales de la nefrona. También se encuentran en la corteza las porciones iniciales de los tubos colectores y una amplia red vascular (Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

Los tubos en la médula forman estructuras cónicas llamadas pirámides renales (10-18 por riñón humano). Cada pirámide está dividida en segmentos denominados médula externa (adyacente a la corteza; subdividida en bandas externa e interna) y médula interna. La papila, porción apical de cada pirámide, se proyecta hacia uno de los cálices menores (representan una extensión de la pelvis renal) y, finalmente, hacia los cálices mayores y pelvis renal. La médula contiene las porciones tubulares rectas de la nefrona (Asa de Henle) y túbulos colectores. Estas estructuras junto con los vasos rectos (sistema de contracorriente) le dan un aspecto estriado a la médula renal (Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

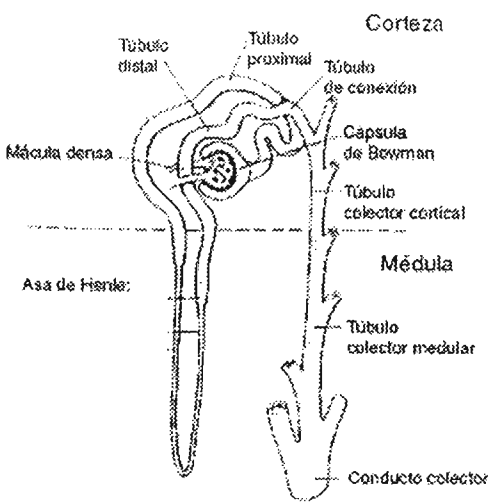


Fig. 17. Diagrama de la nefrona

La unidad estructural y funcional del riñón es la nefrona (Fig. 17). Está compuesta por un corpúsculo renal que contiene glomérulos, agregaciones u ovillos de capilares, rodeados por una capa delgada de revestimiento endotelial, denominada cápsula de Bowman y situada en el extremo ciego de los túbulos renales. Los túbulos renales o sistema tubular transportan la orina a lo largo de su recorrido hasta los túbulos colectores, que desembocan en las papilas renales (Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

Los componentes esenciales de la porción tubular son: túbulo proximal (parte contorneada y recta), segmento delgado del asa de Henle, túbulo distal (parte recta y contorneada) y túbulos colectores (cortical, conector y recto) (Rhodin, 1971; Tisher y Madsen, 2000).

2.2 ERO, enzimas antioxidantes y riñón

Se sabe que la generación de ERO ocurre tanto en glomérulo como en túbulos proximales bajo condiciones basales y como respuesta a varios estímulos (Shah, 1989; Rovin *et al.*, 1990). El daño oxidativo está implicado en varios modelos de daño renal, como cisplatina (Agarwal *et al.*, 1995), $K_2Cr_2O_7$ (Barrera *et al.*, 2003), ciclosporina (Galletti *et al.*, 2005) y glicerol (Nath *et al.*, 1992).

La capacidad del tejido renal para producir ERO se atribuye a la presencia de varias enzimas que producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

En cuanto a la médula, se ha demostrado que la porción ascendente del asa de Henle es una fuente primaria de $O_2^{\cdot-}$ en el riñón (Zou *et al.*, 2001), ya que expresa los principales componentes de la NADPH oxidasa (Tojo *et al.*, 1999; Chabrashvili *et al.*, 2002). Además, en este segmento también se ha detectado actividad de la sintasa de óxido nítrico (Kone, 1999) y la xantina oxidasa (Pawelczyk *et al.* 1992), que también producen $O_2^{\cdot-}$.

También se ha demostrado la producción de $O_2^{\cdot-}$ en la corteza renal, pero en menor proporción que la médula. Esto se ha atribuido a que la presencia de la NADPH oxidasa ocurre principalmente en la médula (Zou *et al.*, 2001).

En cuanto a las enzimas antioxidantes, se ha demostrado que la expresión de MnSOD, Cu/Zn-SOD y catalasa es menor en glomérulo que en túbulos proximales y túbulo intersticial de rata, en cuanto a GPx no se encontró diferencia (Gwinner *et al.*, 1998). Esto fue consistente con los reportes en otros mamíferos, en los que se encontró mayor expresión de SOD, catalasa y GPx en túbulos proximales que en glomérulos, donde la expresión de estas enzimas fue escasa o nula (revisado en Muse *et al.*, 1994). Lo anterior sugiere que el glomérulo es el principal blanco para el ataque de las ERO, ya que la menor actividad de enzimas antioxidantes confiere una mayor susceptibilidad del glomérulo hacia el estrés oxidativo.

3 HEMO OXIGENASA (HO) (E.C. 1.14.99.3)

La hemo oxigenasa cataliza el primer paso de la degradación del grupo hemo en una reacción que requiere O_2 y NADPH, y sus productos son monóxido de carbono (CO), Fe^{2+} y biliverdina (Cable *et al.*, 1997). Esta última se convierte después en bilirrubina por acción de la enzima biliverdina reductasa, en una reacción que también depende de NADPH (Fig. 18). Los subproductos de la actividad de HO tienen un papel importante en las funciones celulares, lo cual puede explicar la presencia de las isoformas de HO en varios tejidos y tipos celulares (Scapagnini *et al.*, 2002).

Se han reportado tres isoformas de HO, denominadas HO-1, HO-2 y HO-3 y codificadas por tres genes diferentes: HO-1 es la isoforma inducible que inicialmente se identificó como una proteína de choque térmico de 32 kDa. HO-2 es catalítica y estructuralmente distinta a HO-1 y es constitutiva. HO-3 se parece más a HO-2 que a HO-1, tiene baja actividad enzimática y podría estar involucrada en la unión o la detección del grupo hemo (Immenschuh y Ramadori, 2000).

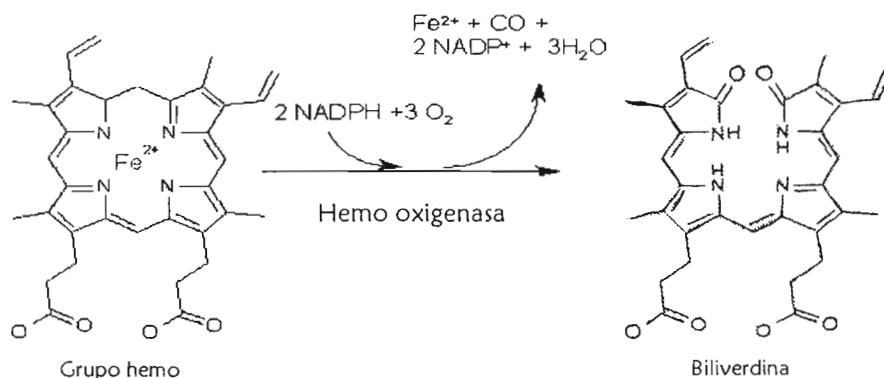


Fig. 18. Reacción que cataliza la HO.

3.1 Hemo oxigenasa-1 (HO-1)

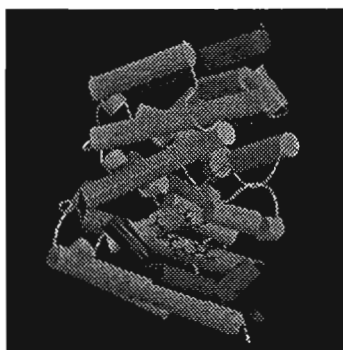


Fig. 19. Estructura cristalina de la HO-1 humana en complejo con su sustrato el grupo hemo.

En 1980 se descubrió una isoforma de la HO, denominada hemo oxigenasa-1 (Fig. 19), que se induce como respuesta al grupo hemo, algunas metaloporfirinas, medicamentos, metales y estímulos que producen estrés, como radiación UV, agentes químicos e hipertermia (Morse y Choi, 2002; Cable et al., 1997). Además de su papel en el catabolismo del grupo hemo, la HO-1 pertenece a un grupo de proteínas denominadas proteínas de choque térmico o estrés. La sobreexpresión de muchas de estas proteínas, incluyendo a la HO-1 se debe a la activación transcripcional (síntesis de ARNm) en respuesta a estímulos extracelulares, usualmente

asociados a daño celular (Ryter y Tyrrel, 1997). La transcripción de HO-1 es promovida por los factores AP-1, AP-2 y NF- κ B, y se ha sugerido que juega un papel citoprotector en modelos relacionados con el daño oxidativo (Takahashi et al., 2004).

Se han estudiado los mecanismos reguladores para esta enzima en una gran variedad de tejidos y sistemas de cultivo (Cable *et al.*, 1997). Muchos de los estímulos que inducen la expresión de HO-1 son prooxidantes, y se han encontrado evidencias acerca del efecto citoprotector de HO-1 en varios modelos *in vitro* e *in vivo* (Kanakiriya y Nath, 2001). La detección de esta isoforma se ha usado como evidencia de estrés oxidativo, y además se ha sugerido que el estado antioxidante de organismos vivos puede modular sus niveles (Yachie *et al.*, 1999).

3.1.1 Estrés oxidativo y HO-1

En varias patologías en las que se ha implicado al estrés oxidativo, se ha reportado la inducción de la HO-1 (Tabla I). Además, se han encontrado evidencias que indican que la sobreexpresión de la HO-1 provee de efecto citoprotector en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, en los que también está involucrado el estrés oxidativo (Tabla II). Por otra parte, la ausencia de HO-1 en un paciente con deficiencia total de HO-1 pero no de HO-2, se acompañó de concentraciones muy altas de grupo hemo (490 μM , normalmente no detectable o <1) y bajas de bilirrubina (~ 0.3 mg/dL, normal 0.2-1.3) en suero. Otras complicaciones de este paciente fueron deposición de hierro en riñón e hígado, hepatomegalia, asplenia, anemia hemolítica, proteinuria, hematuria y producción excesiva de glóbulos blancos y plaquetas (Yachie *et al.*, 1999).

Por su parte, los ratones deficientes en HO-1 presentan hepatomegalia, anemia, deposición de hierro (hígado y riñón), mayor lipoperoxidación y mayor concentración de proteínas oxidadas (hígado y riñón) que los ratones normales. En conjunto, estos datos apoyan que la HO-1 es una enzima con un importante papel protector contra el estrés oxidativo (Poss y Tonegawa, 1997).

Tratando de establecer el mecanismo por el cual la HO-1 presenta el efecto protector, varios grupos han encontrado que el CO puede mediar en gran medida las acciones protectoras de la HO-1 (Galbraith, 1999). También hay datos que indican efectos protectores mediados por ferritina, biliverdina y bilirrubina (Tomaro y Battle, 2002; Barañano *et al.*, 2002; Grosser *et al.*, 2004).

3.1.2 Papel de la expresión de la HO-1 en la insuficiencia renal

Los niveles basales de HO-1 en el riñón son relativamente bajos. Sin embargo, la HO-1 se induce en varios modelos de nefrotoxicidad, como el modelo de rabiomiolisis en ratas (Nath *et al.*, 1992), nefritis nefrotóxica (Vogt *et al.*, 1996), nefrotoxicidad por cisplatina (Agarwal *et al.*, 1995), y daño renal inducido por angiotensina II (Haugen *et al.*, 2000), en los que la inducción de HO-1 ocurre predominantemente en los túbulos proximales. La expresión de HO-1 también se ha reportado en la insuficiencia renal humana, como la que se presenta en pacientes con hemoglobinuria nocturna paroxística (Nath *et al.*, 2001), en que la inducción de la HO-1 también ocurre principalmente en el túbulo proximal.

Tabla I. Sistemas biológicos en donde se encontró mayor cantidad de HO-1.

Sistema biológico	Modelo	Tejido donde se encontró inducción de HO-1	Referencia
Células hepáticas humanas	Hipertensión	Hígado	Makino <i>et al.</i> , 2001
Ratas	Diabetes	Hígado	Cosso <i>et al.</i> , 2001
Ratas	Isquemia cerebral	Hipocampo	Matsuoka <i>et al.</i> , 1999
Cerebro humano postmortem	Parkinson	Sustancia nigra	Schipper <i>et al.</i> , 1998
Ratas	Traumatismo cerebral	Corteza cerebral	Fukuda <i>et al.</i> , 1996
Ratas	Luz visible intensa	Retina	Kutty <i>et al.</i> , 1995
Cerebro humano postmortem	Alzheimer	Hipocampo y corteza temporal	Schipper <i>et al.</i> , 1995
Sangre humana	SIDA	Monocitos y macrófagos	Levere <i>et al.</i> , 1993

Tabla II. Modelos asociados con el estrés oxidativo donde la sobreexpresión de HO-1 ha mostrado efecto protector

Modelo	Efecto de la HO-1	Referencia
Nefrotoxicidad por $K_2Cr_2O_7$ (ratas)	Previene parcialmente la proteinuria y la nitración de proteínas. Previene el aumento de BUN y creatinina.	Barrera <i>et al.</i> , 2003
Nefrotoxicidad por ciclosporina (ratas)	Previene la fibrosis túbulo-intersticial	Rezzani <i>et al.</i> , 2005
I/R en hígado (ratas)	Previene el aumento de SGOT en suero y la expresión de la caspasa-3, aumenta la expresión de Bcl-2	Wang <i>et al.</i> , 2005
Toxicidad por etanol (hepatocitos)	Previene la muerte celular, el incremento de MDA y la disminución de GSH.	Liu <i>et al.</i> , 2004
Toxicidad por beta-amiloide y H_2O_2 (células SN56)	Previene la muerte celular	Le <i>et al.</i> , 1999
Toxicidad por glutamato y H_2O_2 (NGC)	Previene la muerte celular y disminuye la formación de ERO	Chen <i>et al.</i> , 2000

Abreviaturas. I/R: Isquemia-reperfusión. NGC: Neuronas granulares del cerebelo. SGOT: Transaminasa glutámico oxalacética. MDA: Malondialdehído. GSH: Glutación reducido. ERO: Especies reactivas de oxígeno.

El uso de inductores e inhibidores de la HO-1 en diferentes modelos de nefrotoxicidad, ha sugerido que la expresión tubular de HO-1 tiene un efecto citoprotector. Esto se ha observado tanto en modelos de insuficiencia renal aguda donde se da la liberación de grupo hemo (Nath *et al.*, 1992), como en aquellos donde este grupo no está implicado (Agarwal *et al.*, 1995). Dichas observaciones se han corroborado por estudios en ratones carentes de HO-1 (Nath *et al.*, 2000). Por ejemplo, en la nefropatía tóxica inducida por cisplatina, un modelo de insuficiencia renal aguda que no depende directamente de la liberación de hemoproteínas en el riñón, la HO-1 se induce dentro de las 6 primeras horas de la administración de cisplatina, antes de que se detecte daño en la función renal (Agarwal *et al.*, 1995). En ese tiempo, se observó aumento en los niveles de grupo hemo libre, sugiriendo que cuando éste se libera por la desestabilización de hemoproteínas microsomales puede servir como estímulo para la inducción de HO-1 en este modelo (Agarwal *et al.*, 1995).

3.2 Inducción e inhibición de HO-1 por agentes químicos

Algunas metaloporfirinas afectan la expresión de la HO-1. La protoporfirina de cobalto (CoPP, Fig. 20a) es un inductor; la protoporfirina de estaño (SnPP, Fig. 20b) y mesoporfirina de zinc (ZnMP, Fig. 20c) son inhibidores de la HO-1. Estos compuestos se han utilizado para evidenciar la participación de la HO-1 en modelos de diferentes patologías. En la tabla III se enlistan algunos trabajos y el efecto detectado.

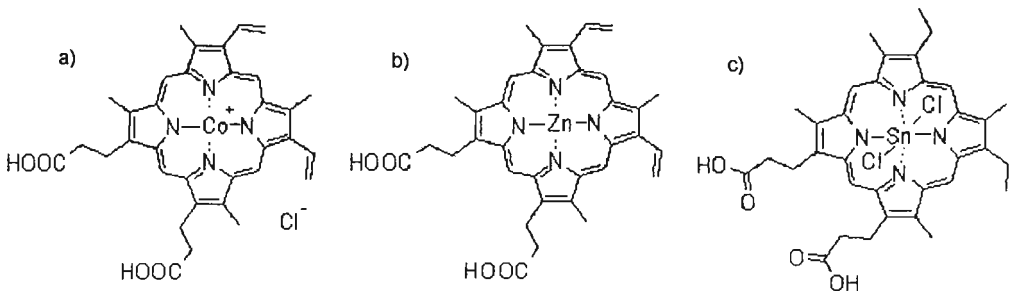


Fig. 20. Estructura química de a) CoPP, b) ZnPP y c) SnMP.

Un compuesto químico que no es una porfirina, pero se sabe que induce potentemente la HO-1 en riñón en una forma altamente específica es el cloruro de estaño: SnCl_2 (Kappas y Maines, 1976). Este compuesto se ha usado en varios estudios; por ejemplo, en un modelo de isquemia/reperfusión se encontró que el pretratamiento con SnCl_2 contrarresta la disfunción renal, al tiempo que produce una elevación marcada del mRNA renal de HO-1 (Toda *et al.*, 2002).

Tabla III. Uso de metaloporfirinas que inducen o inhiben la HO-1

Modelo	Porfirina	Dosis	Efecto de la(s) metaloporfirina(s)	Referencia
Células Jurkat E6-1	CoPP	50 mM	Disminuye la apoptosis mediada por Fas.	Choi <i>et al.</i> , 2004
Diabetes (ratas)	CoPP	0.5 mg/Kg pc i.p.	La CoPP previene el aumento de células endoteliales circulantes y el aumento de O ₂ ^{•-} en aorta. La SnMP bloquea este efecto	Quan <i>et al.</i> , 2004
	SnMP	10o mmol/Kg i.v.		
Hipertensión (ratas)	CoPP	50 mg/Kg pc i.p.	Disminuye la presión arterial y la concentración de 20-HETE en tejido renal.	Abraham <i>et al.</i> , 2002
Isquemia cardiaca (ratas)	CoPP	5 mg/kg s.c.	La CoPP previene el aumento de miocitos y células endoteliales apoptóticas en corazón. Aumenta la expresión de Bcl-2 y Bag-1. La ZnPP bloquea este efecto.	Katori <i>et al.</i> , 2002
	ZnPP	1.5 mg/kg i.v.		
Isquemia hepática (ratas)	CoPP	5 mg/kg i.p.	Previene el aumento de SGOT en suero. La ZnPP bloquea este efecto.	Amersi <i>et al.</i> , 1999
	ZnPP	20 mg/kg i.p.		

Abreviaturas. 20-HETE: Compuesto vasoconstrictor derivado del ácido araquidónico. SGOT: Transaminasa glutámico oxalacética.

4 NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR D-SERINA

4.1 Descripción y estructura química de la D-serina

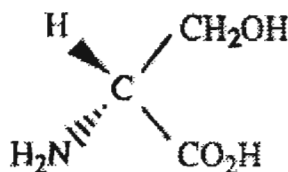


Fig. 21. Estructura química de la D-serina

La D-serina, cuya estructura química se muestra en la Fig. 21, es un D-aminoácido de fórmula química C₃H₇NO₃. Es un agonista endógeno del sitio de glicina del NMDAr (receptor N-metil-D-aspartato) (Dunlop y Neidle, 1997). Este aminoácido se ha encontrado en altas concentraciones en cerebro, y en menor cantidad en tejidos periféricos como hígado y riñón (Wang y Zhu, 2003). Además, es un compuesto nefrotóxico (Hashimoto y Oka, 1997).

4.1.1 Uso terapéutico de la D-serina

La disfunción en la neurotransmisión mediada por el NMDAR y la disminución de la concentración de D-serina en sangre se han implicado en la fisiopatología de la esquizofrenia. Por lo tanto, en los últimos años se han estudiado los efectos de diferentes coagonistas del NMDAR como glicina, D-serina y D-cicloserina en pacientes esquizofrénicos. La administración de D-serina como adyuvante a algunos antipsicóticos convencionales como sulpirida, haloperidol, risperidona y pipotiazina (Tsai *et al.*, 1998) y atípicos como risperidona y olanzapina (Heresco-Levy *et al.*, 2005), ha mejorado en gran medida los síntomas de la esquizofrenia, aunque no ocurrió lo mismo cuando la D-serina se administró en combinación con clozapina (Tsai *et al.*, 1999). Estos estudios se han realizado utilizando pacientes de diferentes regiones del mundo.

4.2 Metabolismo de la D-serina

La D-serina se sintetiza principalmente en cerebro a partir de L-serina por la serina racemasa (Fig. 22), y se degrada por la oxidasa de D-aminoácidos (Fig. 23) presente en el epitelio del túbulo proximal renal (Dunlop y Neidle, 1997).

4.2.1 Serina racemasa (SR)

La SR es una enzima dependiente de piridoxal-5-fosfato, y cataliza la racemización de L-serina a D-serina, mientras que no se ha demostrado que tenga actividad sobre otros aminoácidos (Wolosker *et al.*, 1999). Hace algunos años, se clonó la serina racemasa de ratón (Wolosker *et al.*, 1999) y la de humano (de Miranda *et al.*, 2000), encontrándose entre ellas una identidad de 88%. La SR está formada por 339 aminoácidos y su peso molecular es de 36.3 kDa; el gen de la SR de humano posee 7 exones y se localiza en el cromosoma 17.

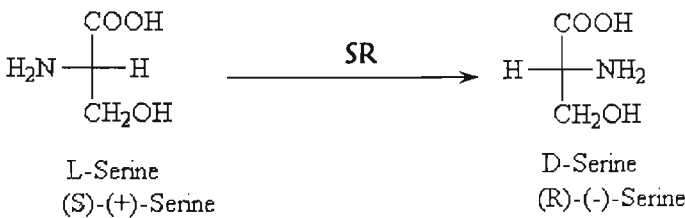


Fig. 22. Racemización de L-serina a D-serina, catalizada por la serina racemasa

4.2.2 Oxidasa de D-aminoácidos (ODA)

La ODA (EC 1.4.3.3) es una flavoenzima peroxisomal que cataliza a pH fisiológico la oxidación estereoespecífica de D-aminoácidos neutros, tales como D-serina, D-prolina y D-alanina a su correspondiente α -cetoácido (Pilone, 2000). En la Fig. 23 se encuentra dicha reacción.

Esta reacción se puede dividir en tres etapas: 1) Semi-reacción reductiva, 2) Semi-reacción oxidativa en la que el FADH es reoxidado por oxígeno molecular, produciéndose H_2O_2 , y 3) el iminoácido formado en el paso anterior sufre una hidrólisis espontánea a amonio y el α -cetoácido correspondiente (Pollegioni *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la mayor actividad de la ODA se encuentra en el riñón, y su menor actividad se encuentra en hígado y sistema nervioso central (Van den Munckhof, 1996).

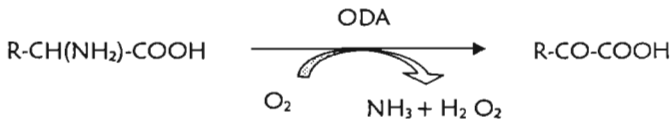
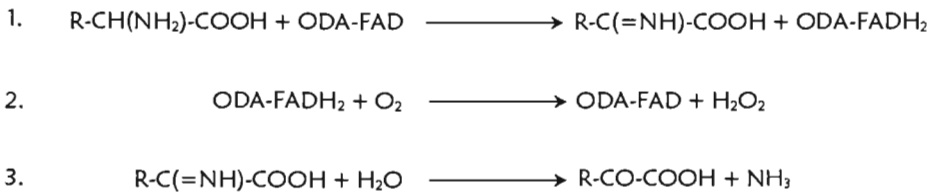


Fig. 23. Reacción catalizada por la oxidasa de D-aminoácidos

4.2 Daño renal inducido por D-serina

En 1942 se reportó por primera vez el efecto nefrotóxico de la D-serina, al encontrar que la administración intragástrica de 1 g/Kg de este aminoácido en ratas provocó anorexia, albuminuria, palidez de las patas y hemorragias bajo las uñas (Fishman y Artom, 1942). Después se describió que la misma dosis provocó aumento del volumen urinario y de la concentración en orina de fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa y deshidrogenasa láctica. No se detectó actividad de succinato deshidrogenasa en orina (Raab *et al.*, 1969).

Al investigar qué estructura renal se dañaba por la administración de D-serina, se encontró que este aminoácido genera necrosis de la porción recta del túbulo proximal en el riñón de las ratas (Wachstein, 1947) evento que se acompañó de diuresis, proteinuria, glucosuria y aminoaciduria. Dosis comparables de L-serina no resultaron nefrotóxicas (Carone y Ganote, 1975).

La observación de cortes transversales de riñón permitió establecer la ausencia de daño estructural durante las primeras 6 horas después de administrar 750 mg/Kg i.p. del aminoácido. A las 7 horas, se encontró necrosis en corteza renal, mayor en corteza interna que en externa, localizada en la porción recta del túbulo proximal. Los cambios ultraestructurales detectados fueron la dispersión de polisomas a ribosomas libres, aparición de vesículas y encogimiento celular. A las 8 horas entre el 80% y el 90% de las células se encontraron necróticas, y a las 24 horas se alcanzó el daño máximo. Las ratas a las que se administró L-serina no presentaron ninguna de estas alteraciones. Al administrar 800 mg/Kg i.p. de D-serina se observaron los mismos cambios descritos para la dosis menor del aminoácido, sólo que más tempranos, encontrando necróticas del 80% al 90% de las células a las 4 horas de administrar D-serina. Para ambas dosis, a los 2 días se observó regeneración del tejido, que fue completa 6 días después de administrar D-serina (Ganote *et al.*, 1974).

Para determinar si la configuración molecular de la D-serina se relacionaba con sus efectos tóxicos, se estudió el efecto de isómeros con estructura similar a la D-serina, sólo el ácido diaminopropiónico resultó nefrotóxico. Una explicación dada a esta observación es que las características de carga y estructura facilitan la entrada a la célula de estos compuestos, lo que alteraría las propiedades osmóticas y electroquímicas de la célula. Otra explicación es que la D-serine se intercambie por bases naturales como la fosfatidilserina, cambiando la configuración e integridad de las membranas (Kaltenbach *et al.*, 1979).

Desde 1984 se encontró evidencia de que la D-serina y la L-serina se reabsorben por el mismo sistema de transporte (Kragh-Hansen y Sheikh, 1984). Posteriormente, se determinó la presencia en el túbulo proximal de un transportador con baja estereoespecificidad, el cual es mediador de la reabsorción de la D-serina y su estereoisómero (Silbernagl *et al.*, 1999).

La administración de 700 mg/Kg i.v. de D-serina marcada radiativamente permitió establecer que este aminoácido se distribuye en todos los tejidos, concentrándose principalmente en el área cortico-medular del riñón, donde la marca radiativa se aprecia aún 24 horas después.

Esto sugiere que la reabsorción exhaustiva de D-serina en los túbulos proximales estaría relacionada con la nefrotoxicidad de este aminoácido (Imai *et al.*, 1998).

En pacientes con disfunción renal, se han encontrado concentraciones mayores de D-serina que en el suero de voluntarios sanos (Brückner y Hausch, 1993), y se ha planteado que existe una correlación positiva entre la concentración de D-serina y D-aspartato con la concentración de creatinina en suero de pacientes con disfunción renal (Nagata *et al.*, 1987; Brückner y Hausch, 1993). Un efecto más de la D-serina en el riñón, es que su administración subcutánea incrementó el número y tamaño de los tumores tubulares que desarrollaron las ratas tratadas con N-etil-N-hidroxietilnitrosamina (Hiasa *et al.*, 1984).

Hasta ahora no se sabe cuál es el mecanismo por el que la D-serina produce el daño renal.

4.3 Estrés oxidativo y nefrotoxicidad inducida por D-serina

La D-serina es reabsorbida en la porción recta del túbulo proximal (Silbernagl *et al.*, 1999), donde la ODA la metaboliza. Como esta reacción genera H_2O_2 (Fig. 21), se ha sugerido que el estrés oxidativo podría contribuir al mecanismo de nefrotoxicidad en este modelo de daño renal, sin embargo dicho mecanismo aún permanece sin estudiar. El único reporte donde se involucra la participación del estrés oxidativo en la nefrotoxicidad de la D-serina menciona que ésta se acompaña de depleción de GSH y excreción de aminoácidos, efectos que se previnieron al administrar GSH a las ratas (Silbernagl *et al.*, 1997).

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la D-serina es un aminoácido nefrotóxico pero no se conoce aún cuál es el mecanismo por el que induce daño, y aunque se ha postulado que el estrés oxidativo pudiera estar involucrado, no se ha comprobado. Por otra parte, se sabe que la expresión de la HO-1 es una respuesta celular al estrés oxidativo, pero no se ha estudiado si la expresión de la HO-1 tiene algún papel funcional en la nefrotoxicidad por D-serina.

HIPÓTESIS

Si el estrés oxidativo se encuentra implicado en la insuficiencia renal inducida por D-serina, se esperaría que la HO-1 se exprese después de la administración de este aminoácido. Además, se esperaría que la sobreexpresión de la HO-1 atenúe y su inhibición exacerbe la nefrotoxicidad por D-serina.

OBJETIVOS

- Objetivo general:

Estudiar la expresión y el papel funcional de la HO-1 en la nefrotoxicidad inducida por D-serina.

- Objetivos particulares:

- i) Estudiar si el estrés oxidativo está implicado en la insuficiencia renal inducida por D-serina,
- ii) Estudiar la expresión de la HO-1 en riñón, después de la administración de D-serina.
- iii) Establecer si la sobreexpresión de HO-1 atenúa la insuficiencia renal inducida por D-serina, y
- iv) Establecer si la inhibición de HO-1 exacerba la insuficiencia renal inducida por D-serina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y equipo

La D-serina, la L-serina, el p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminido, la xantina oxidasa, la xantina, el nitroazul de tetrazolio (NBT), el dietildiocarbamato (DDC), el glutatión reducido, la glutatión reductasa, el NADPH, el ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB), la leupeptina, la pepstatina, la acrilamida, la bisacrilamida, la dinitrofenil hidracina, la 2-vinilpiridina (2-VP) y el sulfato de estreptomycin se compraron en Sigma Chemical Co. (St Louis MO, EUA). El SnCl₂ se compró en JT Baker (México). La SnMP se obtuvo en Frontier Scientific (Logan, UT, EUA). Los anticuerpos que se utilizaron para detectar HO-1, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD se compraron en StressGen (Victoria, BC, Canadá) y para detectar catalasa en Calbiochem (San Diego, CA, EUA). Para la detección por western blot se usó un estuche de quimioluminiscencia de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). Se utilizó un homogenizador tipo politrón Brinkman, una centrifuga de mesa no refrigerada IEC HN-SII, una microcentrifuga y una ultracentrifuga refrigeradas Beckman, un espectrofotómetro Beckman, un autoanalizador Bayer RA1000, cámaras de electroforesis y de transferencia Hoefer.

2. Animales y estrategia experimental

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 180-200 g de peso (Harlan Teklad, México), que se mantuvieron durante todo el tratamiento en cajas metabólicas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12h (6:00 – 18:00 h), con alimentación y agua *ad libitum*.

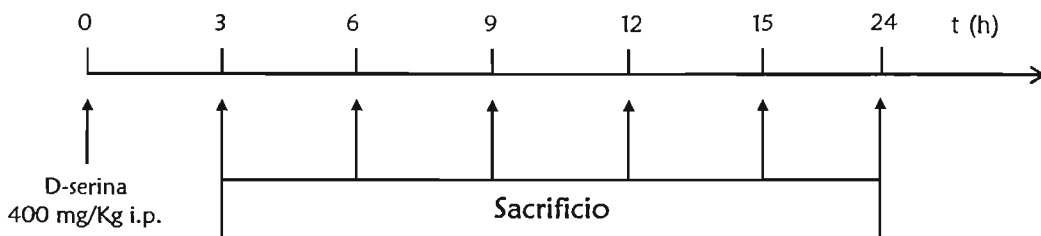
2.1 Tratamiento de los animales y obtención de muestras

En nuestro laboratorio se comprobó que la dosis de 400 mg/Kg de D-serina es nefrotóxica y no induce pérdida de peso 24 horas después, por lo que se eligió dicha dosis para iniciar este trabajo.

Esquema 1: Se estudió el curso temporal de la nefrotoxicidad por D-serina (Fig. 24), para lo que se utilizaron 18 ratas que formaron los siguientes grupos:

- i) grupo control: L-serina, dosis 400 mg/Kg i.p. (n=3)
- ii) grupos 3, 6, 9, 12 y 15 h: D-serina, dosis 400 mg/Kg i.p. (n=3 por tiempo)

Los animales se sacrificaron por decapitación 3, 6, 9, 12 y 15 horas después de administrado el aminoácido. Las ratas control se sacrificaron 15 horas después de administrar L-serina. De cada animal se extrajeron los dos riñones, se rebanaron en cortes transversales y se congelaron



En cada tiempo, n=3 y se utilizaron 3 ratas control a las que se administró L-serina.

Fig. 24. Curso temporal del daño por 400 mg/Kg de D-serina

inmediatamente con nitrógeno líquido. También se recolectó sangre para separar el suero.

Esquema 2: Se estudió el papel de la HO-1 en la insuficiencia renal producida por 400 mg/Kg de D-serina (Fig. 25). Se utilizaron 24 ratas para formar los siguientes grupos (n=6):

- i) grupo 1: L-serina (control), dosis 400 mg/Kg i.p. (Pedraza-Chaverrí. Datos no publicados)
- ii) grupo 2: D-serina, dosis 400 mg/Kg i.p.
- iii) grupo 3: SnCl₂, dosis 100 mg/Kg i.p. (Barrera *et al.*, 2003) + D-serina, dosis 400 mg/Kg i.p.
- iv) grupo 4: SnCl₂, dosis 100 mg/Kg i.p. + SnMP, dosis 15 mg/Kg i.p. (Wang *et al.*, 2001) + D-serina, 400 mg/Kg i.p.

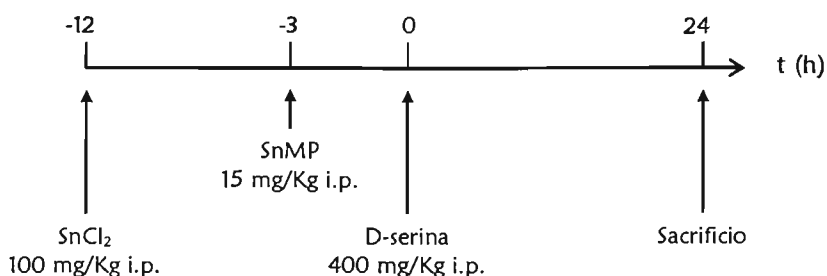


Fig. 25. Papel de la HO-1 en el daño inducido por 400 mg/Kg de D-serina.

En este caso todos los animales se sacrificaron por decapitación 24 horas después de administrar el aminoácido correspondiente. Las muestras recolectadas fueron orina, suero y riñón.

Esquema 3: Finalmente, se estudió el papel de la HO-1 en la insuficiencia renal producida por 800 mg/Kg de D-serina (Fig. 26). Se utilizaron 18 ratas para formar los siguientes grupos (n=6):

- i) grupo 1: L-serina (control), dosis 800 mg/Kg i.p.
- ii) grupo 2: D-serina, dosis 800 mg/Kg i.p. (Silbernagl *et al.*, 1997)
- iii) grupo 3: SnCl₂, dosis 100 mg/Kg i.p. + D-serina, dosis 800 mg/Kg i.p.

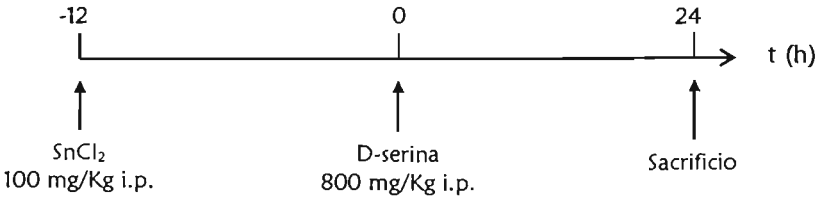
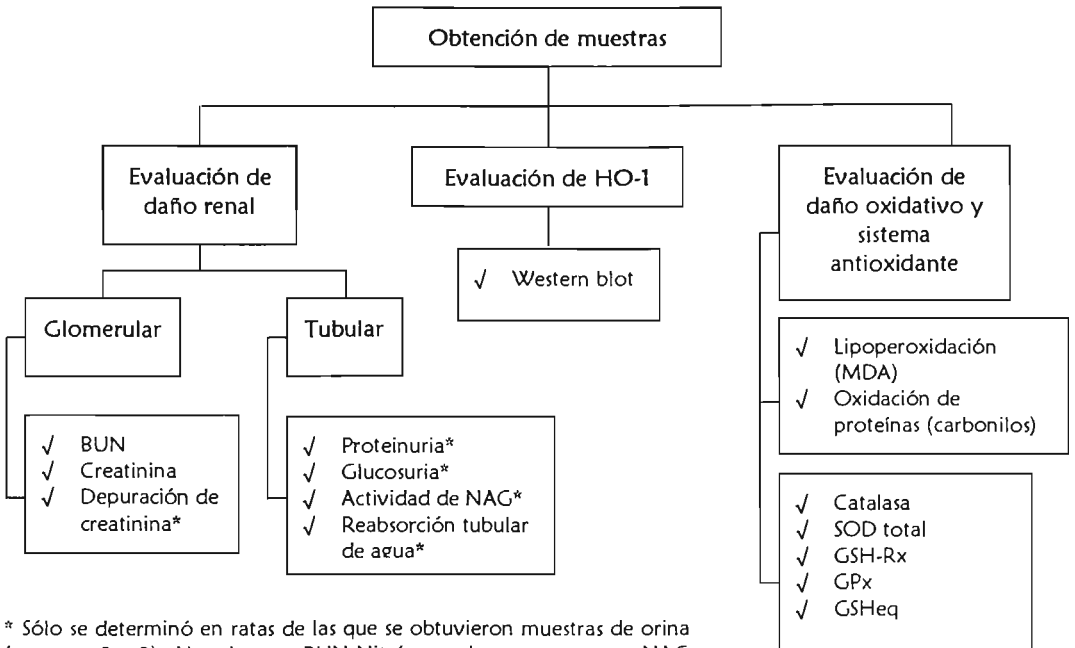


Fig. 26. Papel de la HO-1 en el daño inducido por 800 mg/Kg de D-serina.

También en este caso los animales se sacrificaron por decapitación 24 horas después de administrar el aminoácido correspondiente. Las muestras recolectadas fueron orina, suero y riñón.

Las determinaciones una vez obtenidas las muestras fueron:



* Sólo se determinó en ratas de las que se obtuvieron muestras de orina (esquema 2 y 3). Abreviaturas: BUN Nitrógeno de urea en sangre, NAG N-acetil-β-glucosaminidasa, MDA Malondialdehído. GSHeq Equivalentes de glutatión.

2.2 Tratamiento de las muestras

Orina: La orina recolectada se centrifugó a 3,000 x g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se separó en alícuotas de ~1 ml, se congeló y se almacenó a -75°C hasta su análisis.

Suero: La sangre recolectada de las ratas al momento de su sacrificio se dejó coagular (~30 min). Después de centrifugar a 3,000 x g por 10 min a temperatura ambiente, se separó el suero en alícuotas de ~ 300 µl que se congelaron y se mantuvieron a -75°C hasta su análisis.

Homogenados para medir actividad enzimática y proteínas oxidadas. De cortes transversales congelados de riñón completo se separó la cantidad de tejido suficiente para preparar homogenados 1:10 (p/v) en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, tritón x-100 1%. Este homogenado se centrifugó a 15,000 x g por 1 h a 4°C y se separó el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.

Homogenados para western blot. Se prepararon de la misma forma que los homogenados para medir actividad enzimática pero la dilución del tejido fue 1:5 (p/v). El amortiguador de fosfatos contenía además de tritón, inhibidores de proteasas (leupeptina 5 µg/ml y pepstatina 7 µg/ml) y EDTA 1 mM. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.

Microsomos para western blot de HO-1. Se prepararon homogenados de riñón diluido 1:5 (p/v) con amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.4. Se centrifugaron a 3,000 x g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 20 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se centrifugó una vez más a 150,000 x g por 1 hora a 4°C. Esta vez se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.4 con MgCl₂ 2 mM. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.

Homogenados para medir concentración de GSH total y GSSG. Se prepararon homogenados de riñón diluidos 1:10 (p/v) con ácido 5-sulfosalicílico al 5%. Se centrifugaron a 3,000 x g por 10 min a 4°C y se separó el sobrenadante, donde se determinó la concentración de GSH total. Para medir sólo la concentración de GSSG, se llevó a cabo la derivatización del sobrenadante. Para esto, el sobrenadante se neutralizó con NaOH y se incubó con 2-VP durante 1 h a temperatura ambiente.

3. Determinaciones

3.1 Evaluación de insuficiencia renal

3.1.1 Disfunción glomerular

3.1.1.1 Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

La concentración de urea en sangre se determinó mediante un ensayo colorimétrico utilizando un estuche comercial (Spinreact, cat # 1001325). Este ensayo es una adaptación de la reacción propuesta por Jung *et al.* (1975, Fig. 27), que consiste en la formación en medio ácido de un complejo colorido ortoformaldehído-urea que absorbe a 510 nm:

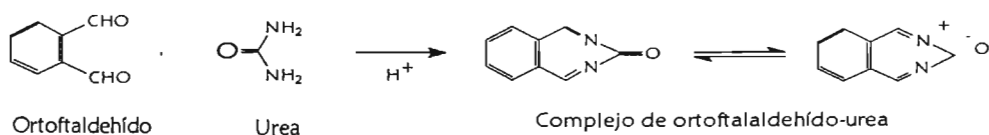


Fig. 27. Reacción propuesta por Jung *et al.* (1975)

Para calcular BUN, se toma en cuenta que en cada molécula de urea hay dos átomos de nitrógeno. Como el peso molecular de cada molécula de urea es de 60 y el peso molecular del nitrógeno es 14, la concentración de urea en sangre se divide entre 2.14 (60/14). La concentración de BUN se expresó en mg/dL.

3.1.1.2 Creatinina y depuración de creatinina

La creatinina presente en el suero y orina se determinó mediante un ensayo colorimétrico con un estuche comercial (Bayer, cat # B014569-01) en un autoanalizador. Este ensayo se conoce como reacción de Jaffé (Fig. 28), que consiste en la formación en medio alcalino de un complejo colorido picrato-creatinina que absorbe a 492 nm:

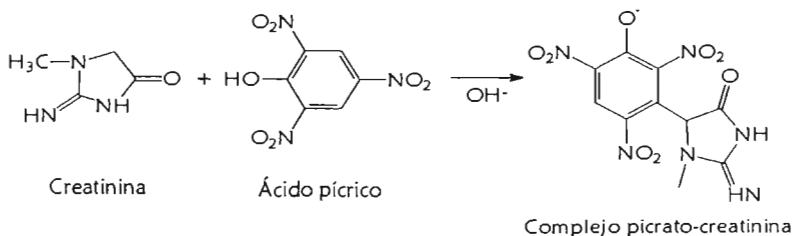


Fig. 28. Reacción de Jaffé.

La depuración de creatinina se calculó tomando en cuenta el volumen urinario de 24 horas, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Depuración de creatinina} = \frac{\text{Creatinina en orina} * \text{volumen urinario en 24h}}{\text{Creatinina en suero} * 1440}$$

La concentración de creatinina se expresó en mg/dL, el volumen urinario en ml. El número 1440 es la cantidad de min en 24 horas. Así, la depuración de creatinina se expresó en ml/min.

3.1.2 Disfunción tubular

3.1.2.1 Proteinuria

La concentración de proteínas totales excretadas por la orina se determinó por turbidez a 420 nm después de su precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 12.5%. Se utilizó un blanco por cada muestra (al que se agregó solución salina en lugar de TCA). Los resultados de las absorbencias se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) entre 0.04 y 0.8 mg/ml. Tomando en cuenta el volumen urinario de 24 horas, el resultado se expresó como mg de proteína/24 h.

3.1.2.2 Glucosuria

La cantidad de glucosa en orina se determinó mediante un ensayo colorimétrico empleando un estuche comercial (Spinreact cat # 1001190). Este ensayo se basa en la reacción de Trinder (Fig. 29), donde la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico formando H_2O_2 . Después, este último se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). La quinona resultante absorbe a 505 nm:



Fig. 29. Reacción de Trinder.

Tomando en cuenta el volumen urinario de 24 horas, la concentración de glucosa se expresó en mg/24h.

3.1.2.3 Actividad de N-acetil-β-glucosaminidasa (NAG) en orina

La actividad de NAG se determinó mediante el ensayo de conversión de p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosamínido en N-acetil-D-glucosa y p-nitrofenol (Fig. 30). Este último compuesto en pH ácido se encuentra protonado y es incoloro, y en medio alcalino pasa a su forma aniónica, presenta color y absorbe a 405 nm:

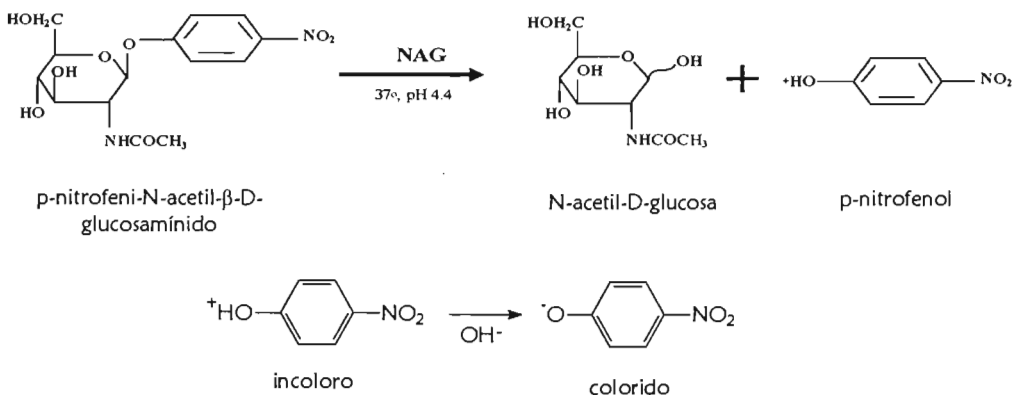


Fig. 30. Ensayo para determinar la actividad de NAG.

Por cada muestra se utilizó un blanco de reacción. Los resultados de las absorbencias se interpolaron en una curva patrón de p-nitrofenol entre 5 y 175 nM. Tomando en cuenta el volumen urinario de 24 horas, el resultado se expresó como unidades de NAG/24 h. La unidad de NAG se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol/min bajo las condiciones del ensayo.

3.1.2.4 Reabsorción tubular de agua

Para estimar este parámetro de insuficiencia renal se utilizó la concentración urinaria y plasmática de creatinina (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1992):

$$\text{Reabsorción tubular de agua} = \frac{\text{creatinina en orina}}{\text{creatinina en plasma}}$$

Por lo tanto, la reabsorción tubular de agua se expresa en forma adimensional.

3.2 Evaluación de la HO-1

Con los homogenizados preparados para western blot se realizó electroforesis SDS-PAGE cargando 50 µg de proteína por pozo, posteriormente la proteína contenida en el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó durante 1 hora con leche descremada al 5% en amortiguador salino de fosfatos. Después, se incubó durante 12 horas a 4°C con anticuerpo policlonal anti-HO-1 (SPA-895, StressGen) producido en conejo, diluido 1:2,000. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (NA-934, Amersham), diluido 1:3,000. Se utilizó un sistema de detección quimioluminiscente (Fig. 31). Para eliminar el exceso de anticuerpo se realizaron lavados con amortiguador salino de fosfatos.

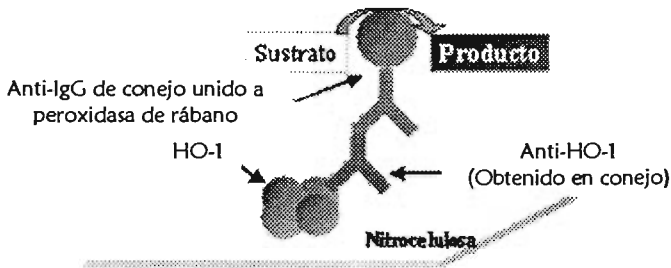


Fig. 31. Detección de la HO-1 por western blot.

3.3 Evaluación de daño oxidativo y sistema antioxidante

3.3.1 Lipoperoxidación

La lipoperoxidación se determinó mediante un método colorimétrico (Gerard-Monnier *et al.*, 1998) que se basa en la detección del complejo colorido malondialdehído-1-metil-2-fenilindol que absorbe a 586 nm, formado al reaccionar malondialdehído con 1-metil-2-fenilindol en medio ácido (Fig. 32):

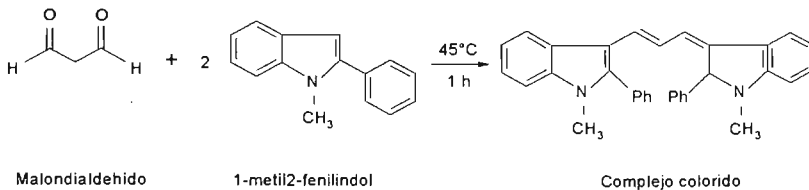


Fig. 32. Reacción para formar un producto colorido a partir de MDA.

Por cada muestra se utilizó un blanco de reacción. Los resultados de las absorbencias se interpolaron en una curva patrón de tetrametoxipropano entre 0.2 y 4 μM . El resultado se expresó como nmol MDA/mg proteína.

3.3.2 Proteínas oxidadas

Para determinar la cantidad de proteínas oxidadas se utilizó un método colorimétrico (Reznick *et al.*, 1994) que se basa en la reactividad de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar un complejo proteína-hidrazona que absorbe a 370 nm (Fig. 33):

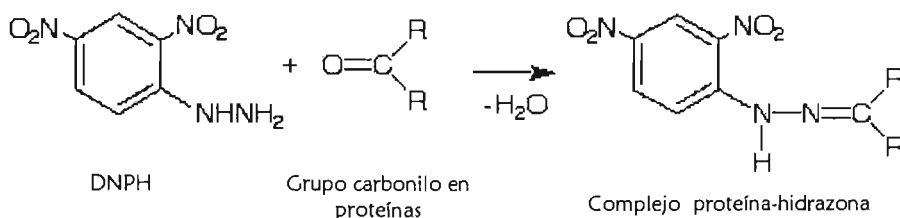


Fig. 33. Reacción para detectar la cantidad de proteínas oxidadas.

El contenido de carbonilos se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar del DNPH ($22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para cada muestra se utilizó un blanco sin DNPH en que además se evaluó el contenido de proteína interpolando el valor de su absorbencia a 280 nm en una curva patrón de ASB entre 0.25 y 2 mg/ml. El resultado se expresó como nmol de carbonilos/mg de proteína.

3.3.4 Western blot de Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y catalasa

La cantidad de Mn-SOD, Cu/Zn-SOD y catalasa por western blot se realizó de la misma forma que para la HO-1. Se utilizaron anticuerpos primarios producidos en conejo: i) anti-MnSOD (SOD-111, StressGen) diluido 1:5,000, ii) anti Cu/Zn-SOD (SOD-101, StressGen) diluido 1:8,000, y iii) anti-catalasa (219010, Calbiochem) diluido 1:400. El anticuerpo anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (NA-934, Amersham) se utilizó diluido 1:5,000 en todos estos casos.

La cuantificación se realizó mediante un software de densitometría (Sigma Scan Pro 4.0, San Rafael, EUA) y los resultados se expresaron como porcentaje de área marcada, considerando 100% el promedio de las muestras correspondientes a los grupos control.

3.3.5 Actividad enzimática de SOD total

La actividad de la SOD total se midió según lo descrito anteriormente (Oberley y Spitz, 1984), mediante la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán, que absorbe a 560 nm. Esta reducción la lleva a cabo el anión superóxido generado mediante el sistema xantina-xantina oxidasa (Fig. 34). La SOD presente en la muestra al catalizar la dismutación del anión superóxido, evita que éste reaccione con el NBT, con lo que es menor la formación de formazán.

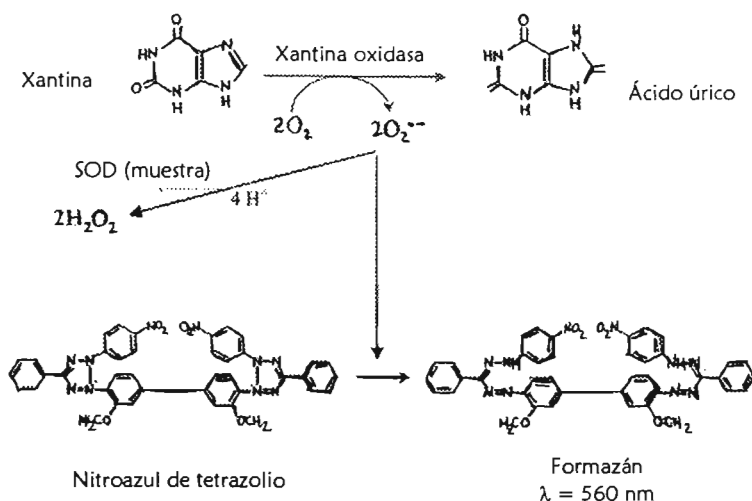


Fig. 34. Sistema de reacciones que permiten medir la actividad de SOD.

Por cada muestra se utilizó un blanco con agua en lugar de xantina oxidasa. Los resultados se expresaron como unidades de SOD/mg de proteína. La unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reducción del NBT bajo las condiciones del ensayo.

3.3.6 Actividad enzimática de catalasa

Se basa en la disminución de la absorbencia del H_2O_2 a 240 nm, lo cual ocurre debido a la acción de la catalasa presente en la muestra de acuerdo a un método ya descrito (Aebi, 1984). De acuerdo con este método, se utiliza la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, y queda definida de acuerdo con la fórmula:

$$k = \frac{1}{t} * \frac{2.3 \log A_1}{A_2}$$

donde A_1 y A_2 son las absorbencias de H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 , y t es el intervalo de tiempo medido.

El resultado se expresó como k /mg de proteína.

3.3.7 Actividad enzimática de GSH-Rx

Para medir la actividad de la GSH-Rx se siguió el método de Carlberg y Mannervick (1975), en el cual se mide a 340 nm la disminución de la cantidad de NADPH al ser consumido por la conversión de GSSG a GSH en la reacción catalizada por la GSH-Rx (Fig. 35) presente en la muestra:

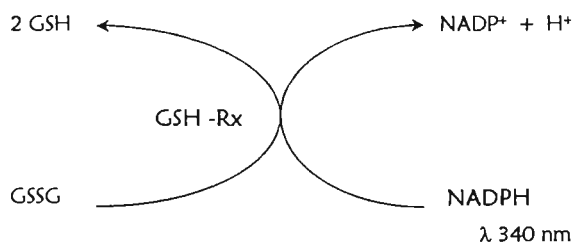


Fig. 35. Reacción que cataliza la GSH-Rx.

Los resultados se expresaron como unidades de GSH-Rx/mg de proteína. La unidad de GSH-Rx se define como la oxidación de 1 μ mol de NADPH por min bajo las condiciones del ensayo.

3.3.8 Actividad enzimática de GPx

La actividad de la GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la GSH-Rx (Lawrence y Burk, 1976). Se basa en la disminución de la absorbencia a 340 nm debido a la reducción de la cantidad de NADPH. La GPx al reducir H₂O₂ consume GSH y genera GSSG, el cual es convertido de nuevo en GSH por la GSH-Rx, proceso que consume NADPH (Fig. 36).

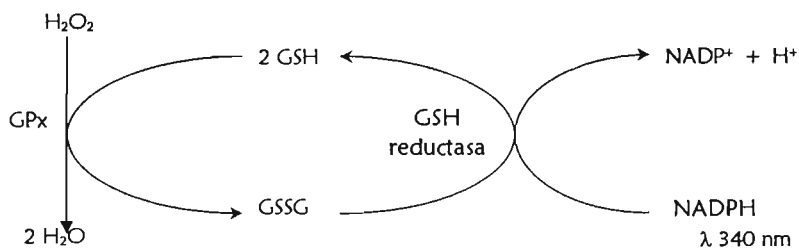


Fig. 36. Papel de la HO-1 en el daño inducido por 800 mg/Kg de D-serina.

3.3.9 Determinación de GSHeq y GSSG

La determinación de equivalentes de glutatión (GSHeq) y GSSG se basa en la detección a 412 nm de la especie producida por la ruptura (por GSH-Rx) del compuesto formado en la reacción de GSH con DTNB (Fig. 37), según lo ya descrito (Griffith, 1980). Para medir la concentración de GSH total se usó riñón homogenizado en ácido 5-sulfosalicílico y para medir GSSG, se usó homogenizado derivatizado con 2-VP. La velocidad de reacción es proporcional a la concentración de GSH. Para calcular la concentración de GSH se utilizó una curva patrón construida con la velocidad de reacción de soluciones de GSH de 0-8 μM . Para calcular la de GSSG se utilizó una curva construida con la velocidad de reacción de soluciones de GSSG de 0-4 μM .

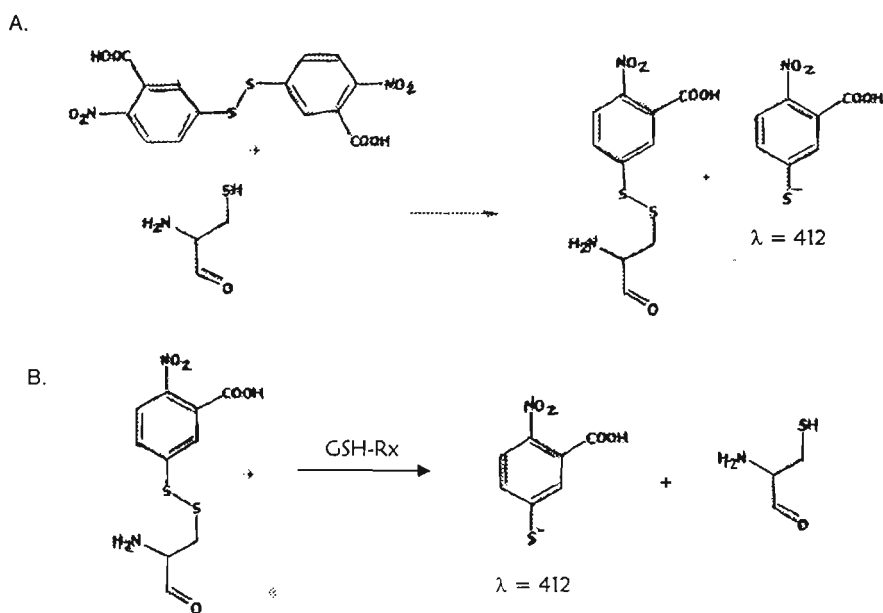


Fig. 37. Reacciones que llevan a la formación de un compuesto colorido a partir de GSH y DTNB.

La cantidad de GSH se obtuvo por diferencia entre GSHeq y GSSG, según la fórmula:

$$GSH = GSHeq - 2GSSG$$

La concentración de glutatión se expresó como $\mu\text{mol/g}$ de tejido.

3.3.10 Producción de nitritos y nitratos.

La cantidad de óxido nítrico (ON^+) producido se estimó mediante la cuantificación de sus metabolitos estables, los nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), usando la reacción de Griess (Fig. 38) (Green *et al.*, 1982). La determinación consistió en incubar una muestra de orina con la bacteria *Escherichia coli* a 37°C por 60 min. Con esto, la enzima nitrato reductasa de la bacteria reduce los nitratos presentes en la muestra, generando nitritos. Finalmente, se determinó la cantidad de nitritos al hacerlos reaccionar con ácido sulfanílico y N-naftiletildiamina, y se interpoló la absorbencia a 543 nm en una curva estándar de nitrito de sodio. El resultado se expresó como $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.

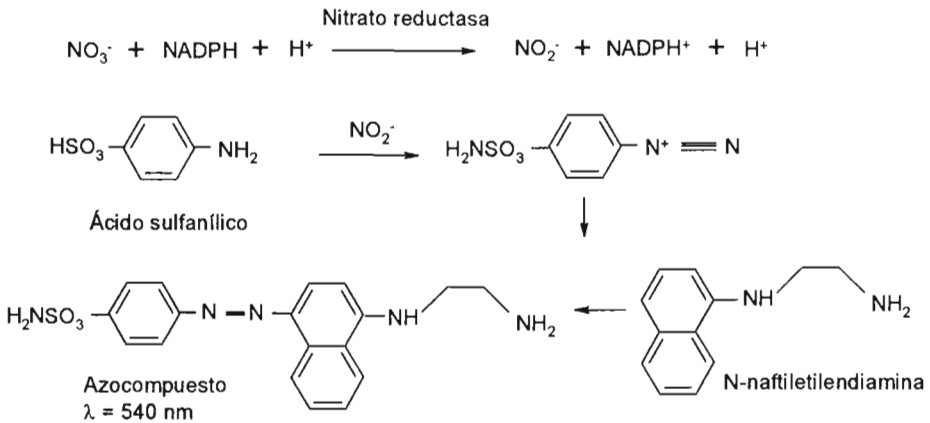


Fig. 38. Reacción de Griess.

4. Análisis estadístico

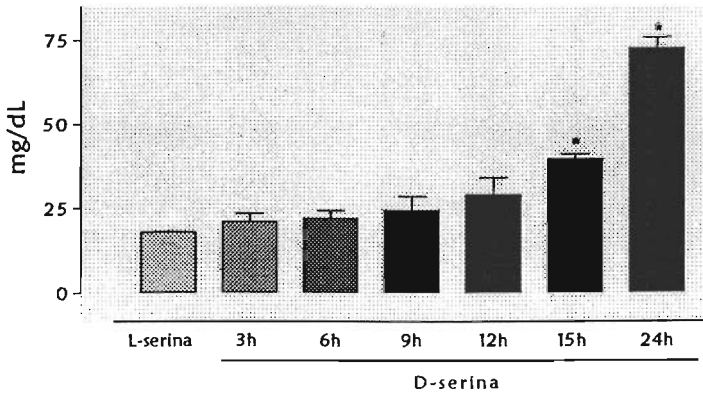
Los datos están expresados como media \pm error estándar de la media (EEM). Se analizaron con el programa Prism 3.0 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) usando la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Dunnett (Esquema 1) o la de comparaciones múltiples de Bonferroni (Esquemas 2 y 3). Las diferencias se consideraron significativas a valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Esquema I: Curso temporal de la nefrototoxicidad por D-serina, dosis 400 mg/Kg.

Evaluación de insuficiencia renal. La disfunción glomerular se determinó mediante la evaluación de BUN y creatinina en suero (Fig. 39). Ambos marcadores presentaron la misma respuesta al aumentar respecto al tiempo. La concentración de BUN fue significativamente diferente 15 horas después de la administración de D-serina, al ser ~ 2 veces mayor respecto al control, y a las 24 horas cuando el aumento fue de ~ 4 veces. Por su parte, la creatinina en suero fue significativamente diferente sólo a las 24 horas, cuando su concentración llegó a ser ~ 6 veces mayor respecto al control.

Nitrógeno de urea en sangre



Creatinina en suero

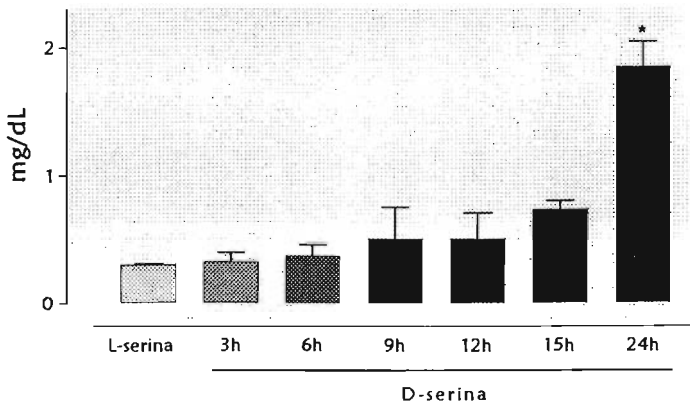
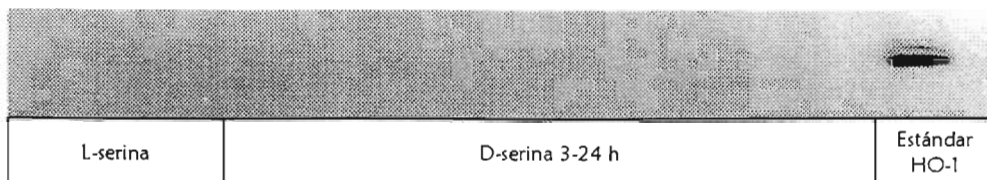


Fig. 39. Parámetros de función renal, esquema I. * $p < 0.001$ vs L-serina. Valores: $\bar{x} \pm$ EEM.

Expresión de la HO-1. La expresión de HO-1 se determinó por western blot (Fig. 40), en ningún tiempo se detectó la presencia de esta enzima, ni en el grupo control, ni en ninguno de los grupos administrados con D-serina. El mismo resultado se obtuvo tanto en homogenado total como en microsomas.

A



B



Control de carga de β -actina:

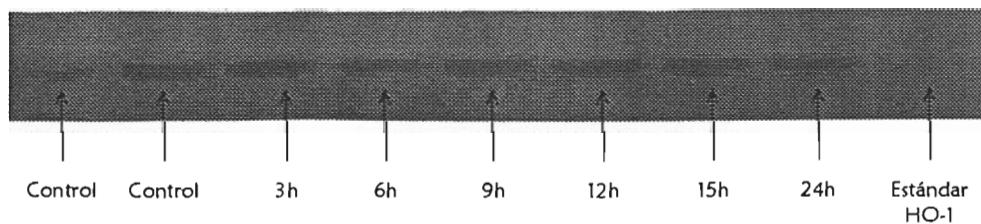


Fig. 40. Expresión de HO-1 en riñón evaluada por Western blot en el esquema 1. A) Riñón total, B) Microsomas.

Marcadores de daño oxidativo. Se determinó la concentración de malondialdehído y la de proteínas oxidadas (Fig. 41). La respuesta de ambos marcadores fue similar, ya que no se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados con D-serina y el grupo control.

Enzimas antioxidantes. Para evaluar los posibles cambios en el sistema antioxidante enzimático, se determinó la expresión de las enzimas antioxidantes catalasa, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD mediante western blot (Fig. 42). No se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados con D-serina y su control para ninguna de estas enzimas.

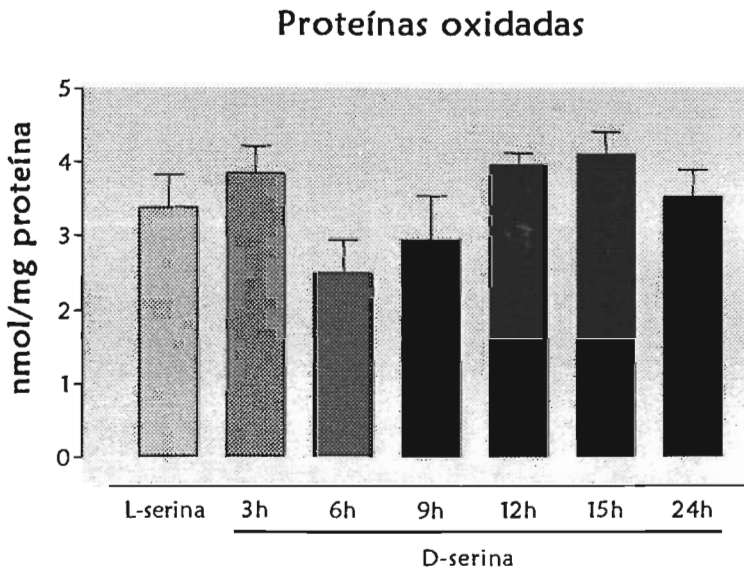
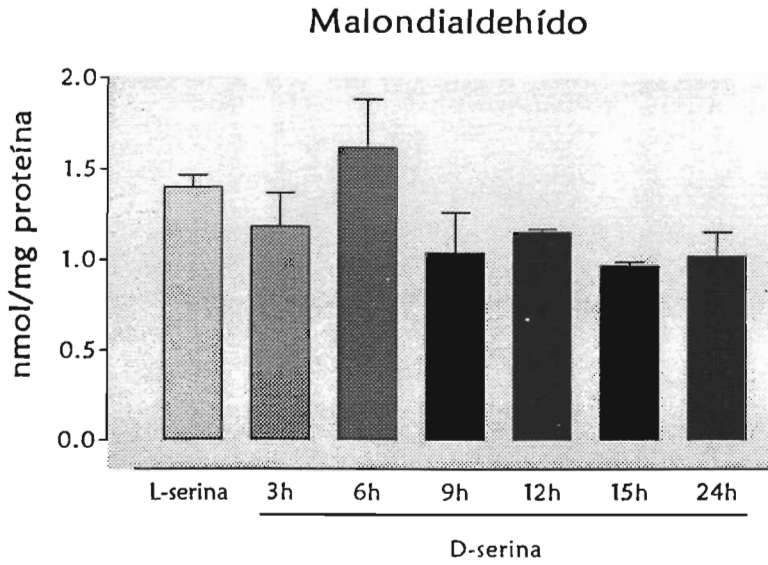


Fig. 41. Parámetros de daño oxidativo en el esquema 1. No hay diferencia significativa de ninguno de los grupos con respecto al control. Valores: $\bar{x} \pm EEM$.

Además se midió la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, SOD total, GSH-Rx y GPx (Tabla IV). Tampoco se detectaron cambios significativos en la actividad enzimática de ninguna de las enzimas.

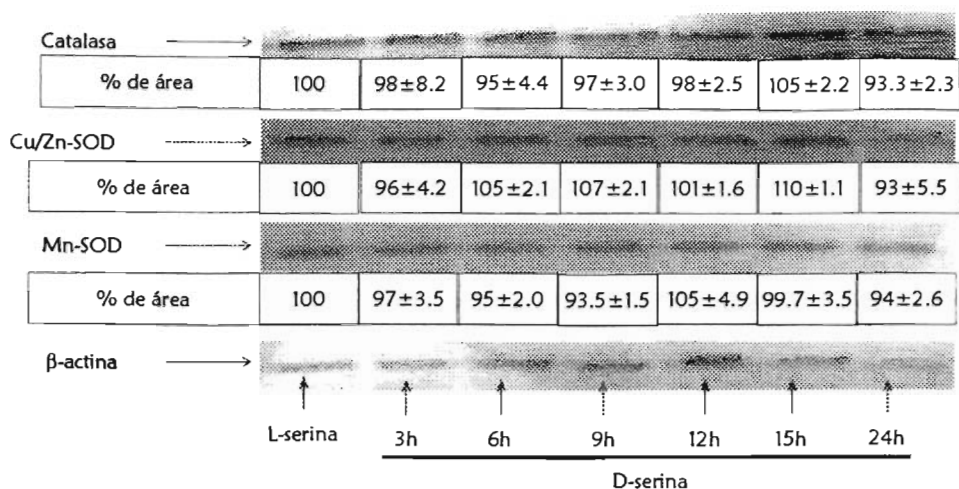


Fig. 42. Expresión de catalasa, Cu/Zn-SOD y Mn-SOD evaluada mediante western blot en el esquema 1.

Tabla IV. Actividad de enzimas antioxidantes en el esquema 1.

	Catalasa*	SOD total**	GPx**	GSH-Rx**
CT	0.6 ± 0.011	13.86 ± 1.5	0.045 ± 0.005	0.073 ± 0.002
3h	0.6 ± 0.014	15.39 ± 0.9	0.048 ± 0.005	0.081 ± 0.006
6h	0.6 ± 0.016	16.08 ± 1.2	0.048 ± 0.004	0.080 ± 0.007
9h	0.6 ± 0.010	14.78 ± 1.4	0.044 ± 0.002	0.073 ± 0.007
12h	0.6 ± 0.009	16.28 ± 0.7	0.046 ± 0.003	0.075 ± 0.002
15h	0.5 ± 0.010	17.02 ± 0.4	0.046 ± 0.003	0.074 ± 0.009
24h	0.4 ± 0.013	14.95 ± 1.7	0.042 ± 0.004	0.066 ± 0.002

* k/mg proteína, ** U/mg proteína. Valores: $\bar{x} \pm EEM$.

Contenido de GSH. Del sistema antioxidante no enzimático se evaluó la concentración de GSHeq y GSSG, con lo que se calculó GSH, GSH/GSSG y (GSHtot/GSH)*100 (Tabla V). En ninguno de estos parámetros es significativa la diferencia entre el grupo control y los tratados con D-serina.

Tabla V. Contenido de glutatión

	GSH eq*	GSSG*	GSH*	GSH/GSSG	(GSHeq/GSH)*100
CT	5.4 ± 0.2	0.29 ± 0.07	4.8 ± 0.2	17.7 ± 3.5	89.1 ± 2.1
3h	4.6 ± 0.3	0.29 ± 0.02	4.0 ± 0.3	14.3 ± 1.2	87.4 ± 1.0
6h	5.8 ± 0.4	0.32 ± 0.02	5.2 ± 0.9	16.3 ± 2.2	88.6 ± 1.5
9h	3.2 ± 0.6	0.30 ± 0.01	2.6 ± 0.6	8.7 ± 1.5	80.4 ± 3.3
12h	3.3 ± 0.6	0.33 ± 0.03	2.6 ± 0.6	9.7 ± 3.7	79.1 ± 5.5
15h	3.8 ± 0.9	0.25 ± 0.04	3.3 ± 0.9	13.3 ± 2.2	86.1 ± 2.5
24h	4.1 ± 0.4	0.25 ± 0.02	3.6 ± 0.4	14.8 ± 2.4	87.1 ± 1.5

* $\mu\text{mol/g}$ tejido. Valores: $\bar{x} \pm EEM$.

Según estos datos, se comprobó que la D-serina induce insuficiencia renal, pero no se encontró que se encuentre acompañada de la expresión de la HO-1 ni de alteraciones en el sistema antioxidante del riñón.

Esquema 2: Nefrotoxicidad por D-serina, dosis 400 mg/Kg.

Insuficiencia renal. En este esquema la insuficiencia renal se determinó mediante la evaluación de BUN, creatinina en suero y depuración de creatinina como marcadores de disfunción glomerular (Fig. 43). Además, con la evaluación de proteinuria, glucosuria, actividad de NAG en orina y reabsorción tubular de agua como marcadores de disfunción tubular (Fig. 44).

En el grupo de ratas tratadas con D-serina la concentración de BUN aumentó significativamente ~3 veces y la de creatinina en suero ~4 veces, y la depuración de creatinina disminuyó significativamente ~10 veces indicando insuficiencia renal a nivel glomerular. La administración del inductor y/o el inhibidor de HO-1 no modificó la insuficiencia renal.

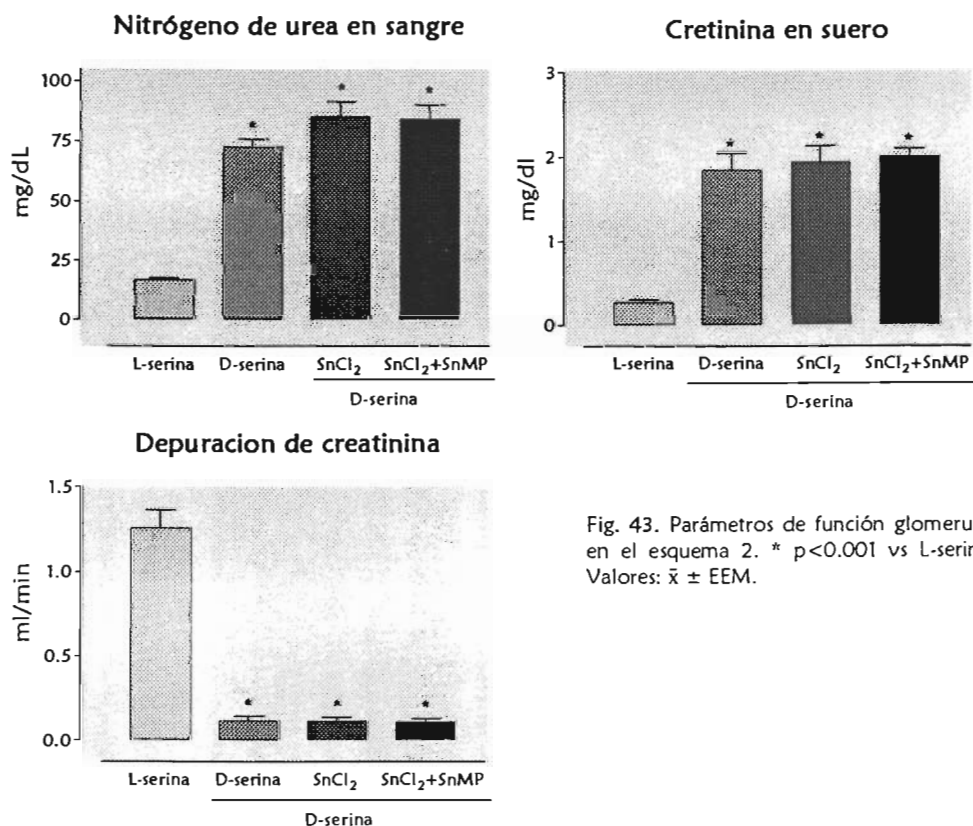


Fig. 43. Parámetros de función glomerular en el esquema 2. * $p < 0.001$ vs L-serina. Valores: $\bar{x} \pm EEM$.

Asimismo, la disfunción tubular inducida por D-serina se reflejó en el aumento de la proteinuria de ~3.5 veces, la excreción de glucosa en grandes cantidades por orina, el aumento de ~18 en la actividad de NAG en orina y la disminución de ~27 veces en la reabsorción tubular de agua. En todos los casos, la presencia del inductor y/o inhibidor de HO-1 no modificó la disfunción tubular.

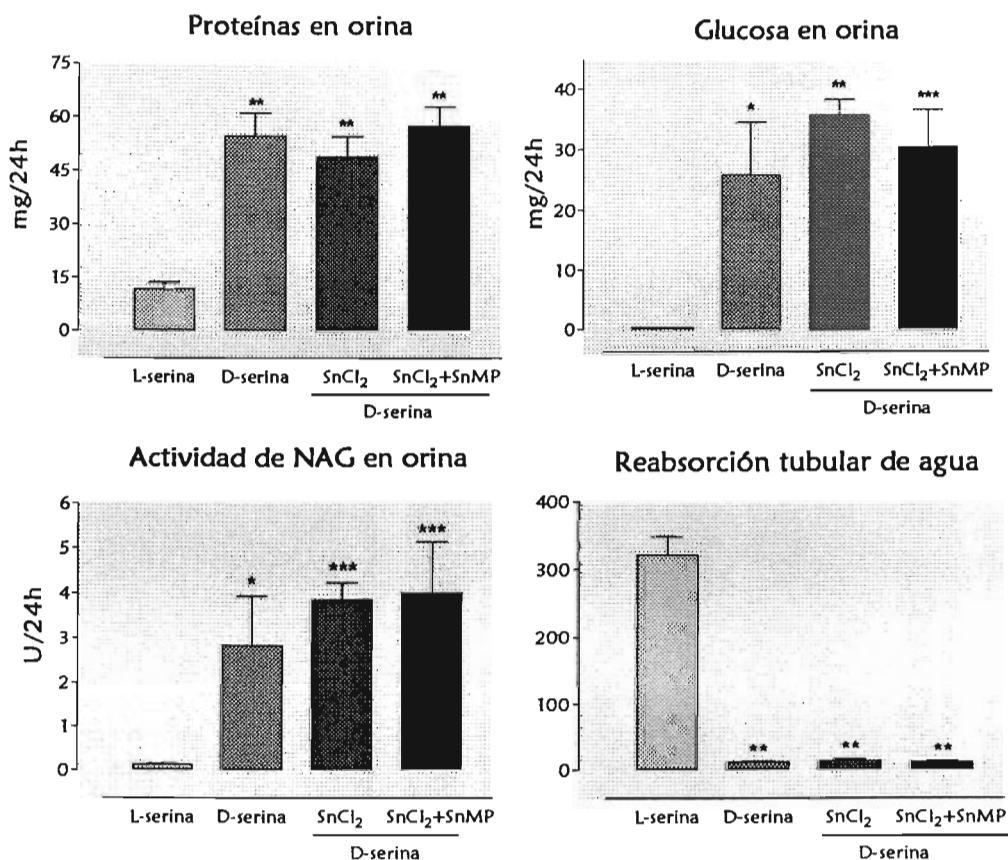


Fig. 44. Parámetros de función tubular del esquema 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.01$ vs L-serina. Valores: $\bar{x} \pm EEM$.

Expresión de la HO-1. En los grupos control y D-serina no se detectó la expresión de la HO-1, en cambio, sí se encontró en los grupos administrados con SnCl₂, con lo que se comprobó la inducción de la HO-1 por SnCl₂ pero no por D o L-serina (Fig. 45). La administración de SnMP no afectó la cantidad de HO-1.

Riñón total

β -actina

L-serina	+	-	-	-	-
D-serina	-	+	+	+	-
SnCl ₂	-	-	+	+	-
SnMP	-	-	-	+	-
Std HO-1	-	-	-	-	+

Fig. 45. Expresión de HO-1 en riñón evaluada por Western blot en el esquema 2.

Marcadores de daño oxidativo. Se determinó la concentración de malondialdehído y la de proteínas oxidadas (Fig. 46). La respuesta de ambos marcadores es congruente, ya que no se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados con D-serina y el grupo control. Además, la administración del inductor y/o inhibidor no modificó significativamente la cantidad de MDA o proteínas oxidadas respecto al control o D-serina. A pesar de esto, la concentración de proteínas oxidadas del grupo tratado con inductor e inhibidor de HO-1 sí es mayor y significativamente diferente a la del grupo tratado sólo con inductor.

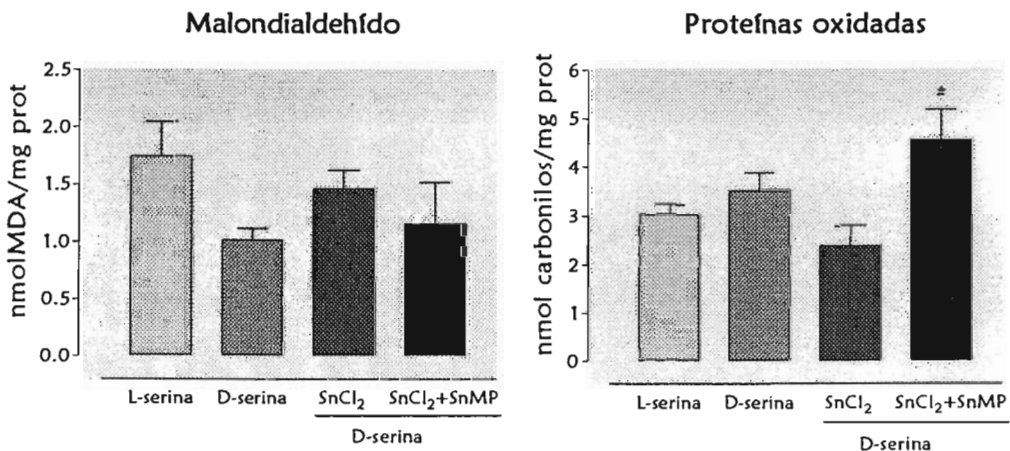


Fig. 46. Parámetros de daño oxidativo en el esquema 2. No hay diferencia significativa de ninguno de los grupos con respecto al control. * $p < 0.05$ vs SnCl₂. Valores: $\bar{x} \pm$ EEM.

Enzimas antioxidantes. La expresión de Mn-SOD y Cu/Zn-SOD (Fig. 47) no sufrió cambio significativo en ninguno de los grupos. La expresión de catalasa disminuyó en los grupos tratados con SnCl₂ y SnCl₂ + SnMP. En cuanto a la actividad enzimática de catalasa, SOD total, GSH-Rx y GPx (Tabla VI), no se detectó cambio significativo entre el grupo de D-serina y el control.

En cambio, los grupos tratados con inductor y/o inhibidor sí mostraron una disminución significativa en la actividad de catalasa. Además, el grupo tratado con inductor e inhibidor también mostró una actividad menor de GPx.

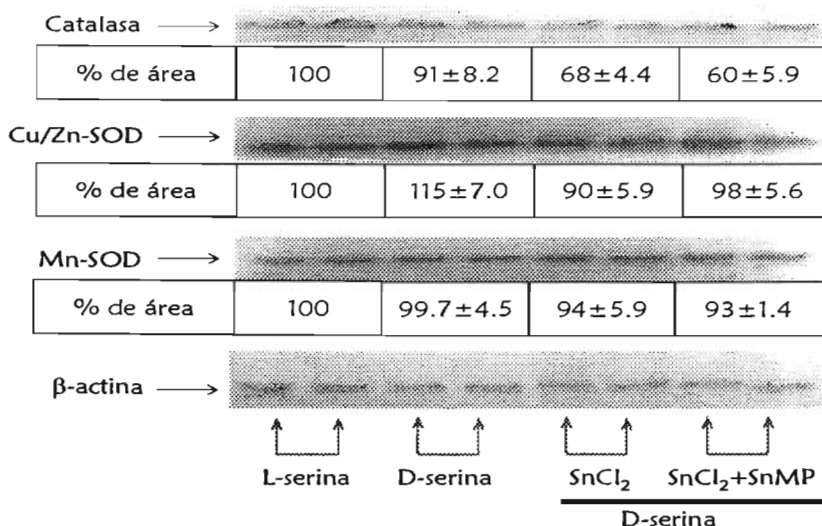


Fig. 47. Expresión de catalasa, Cu/ZnSOD y MnSOD evaluada mediante western blot en el esquema 2.

Tabla VI. Actividad de enzimas antioxidantes en el esquema 2.

	Catalasa*	SOD total**	GPx**	GSH-Rx**
L-serina	0.6 ± 0.04	13.5 ± 0.8	0.05 ± 0.006	0.07 ± 0.003
D-serina	0.4 ± 0.02	15.0 ± 1.8	0.04 ± 0.004	0.07 ± 0.002
SnCl ₂ +D-serina	0.4 ± 0.03**	8.9 ± 1.4 [#]	0.04 ± 0.001	0.06 ± 0.003
SnCl ₂ +SnMP+D-serina	0.3 ± 0.03***	12.6 ± 1.3	0.02 ± 0.005**	0.07 ± 0.004

* k/mg proteína, ** U/mg proteína. Valores: $\bar{x} \pm \text{EEM}$. *** $p < 0.01$ y ** $p < 0.05$ vs control. [#] $p < 0.05$ vs D-serina

Estos datos indican que la disfunción renal inducida por D-serina es tanto glomerular como tubular, y no se modifica con el tratamiento de inducción y/o inhibición de la HO-1. Además, la D-serina tampoco modificó la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, pero el tratamiento con inductor y/o inhibidor sí disminuye la actividad de las enzimas que metabolizan el H₂O₂.

Como no se encontró evidencia de daño oxidativo en los datos reunidos hasta este punto, se decidió evaluar los parámetros de daño oxidativo en ratas a las que se les administró una dosis mayor de D-serina (800 mg/Kg).

Esquema 3: Nefrotoxicidad por D-serina, dosis 800 mg/Kg.

Insuficiencia renal. Se determinó con los mismos marcadores que en el esquema 2, es decir, evaluación de BUN, creatinina en suero, depuración de creatinina (disfunción tubular glomerular, Fig. 48), proteinuria, glucosuria y actividad de NAG en orina, además se calculó la reabsorción tubular de agua (disfunción tubular, Fig. 49).

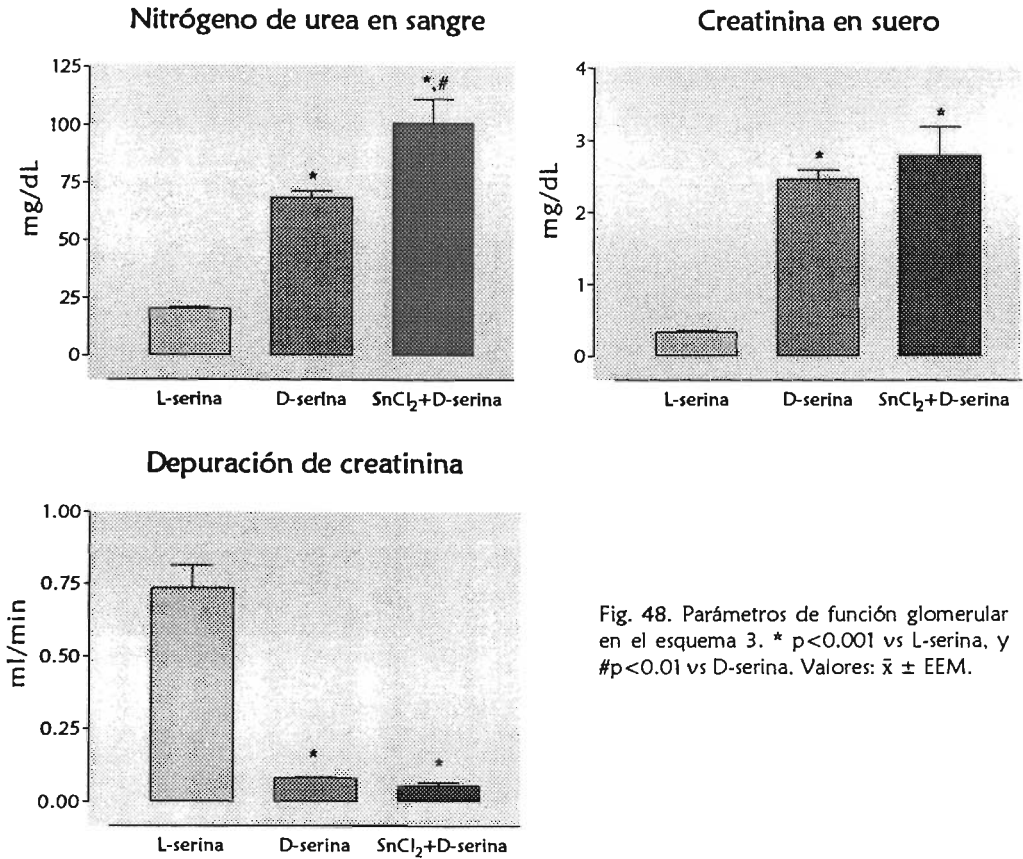


Fig. 48. Parámetros de función glomerular en el esquema 3. * $p < 0.001$ vs L-serina, y # $p < 0.01$ vs D-serina. Valores: $\bar{x} \pm$ EEM.

Al igual que en el esquema 2, la administración de D-serina provocó disfunción glomerular significativa confirmado por los tres marcadores evaluados, y la administración de inductor de HO-1 no disminuyó la disfunción, incluso uno de los marcadores (BUN) indicó que se exagera. Respecto a la disfunción tubular, se obtuvo en general la misma respuesta, a excepción de que en este caso uno de los marcadores (proteinuria) indica que la disfunción disminuye al administrar el inductor de la HO-1.

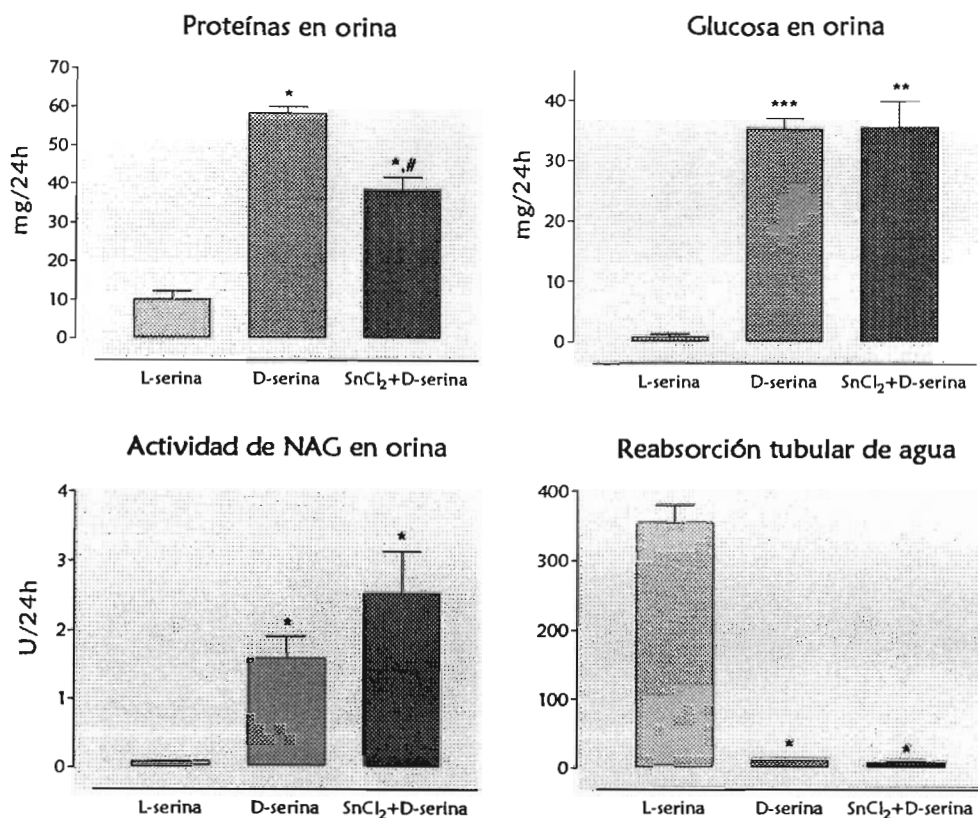


Fig. 49. Parámetros de función tubular del esquema 3. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.05$ vs L-serina. # $p < 0.001$ vs D-serina ** $p < \gamma$ *** $p < \gamma$ Valores: $\bar{x} \pm EEM$.

Expresión de la HO-1. No se detectó la presencia de esta enzima en el grupo control ni el de D-serina, en cambio, la presencia de la enzima sí se encontró en el grupo administrado con SnCl₂, con lo que se comprobó una vez más la inducción de la HO-1 por SnCl₂ pero no por D o L-serina (Fig. 50).

Daño oxidativo. Se midió la concentración de malondialdehído y proteínas oxidadas (Fig. 51), no encontrándose diferencia significativa entre el grupo tratado con D-serina respecto al grupo control. Además, la administración del inductor de HO-1 tampoco modificó la respuesta.

Enzimas antioxidantes. La cantidad de catalasa, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD (Fig. 52) no sufrió cambio significativo en ninguno de los grupos.

Riñón total

β -actina

L-serina	+	-	-	-
D-serina	-	+	+	-
SnCl ₂	-	-	+	-
Estándar HO-1	-	-	-	+

Fig. 50. Expresión de HO-1 en riñón evaluada por Western blot en el esquema 3.

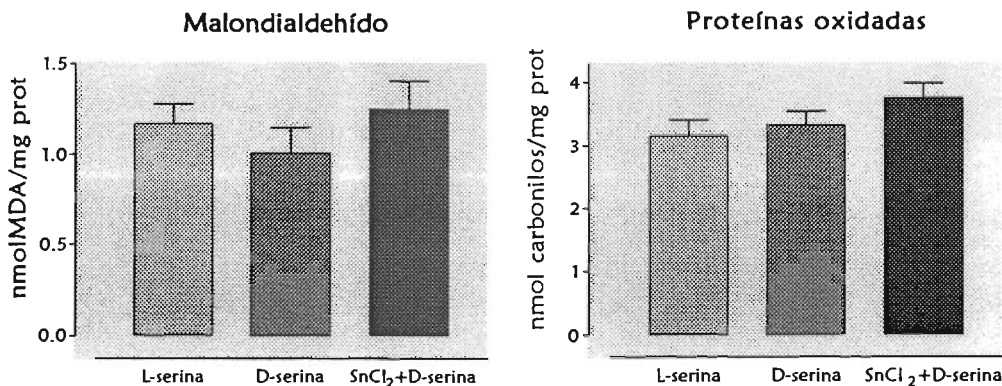


Fig. 51. Parámetros de daño oxidativo en el esquema 3. No hay diferencia significativa de ninguno de los grupos con respecto al control. Valores: $\bar{x} \pm$ EEM.

En cuanto a la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes catalasa, SOD total, GSH-Rx y GPx (Tabla VII), sólo se detectó una disminución significativa en la actividad de catalasa.

Tabla VII. Actividad de enzimas antioxidantes en el esquema 3.

	Catalasa*	SOD total**	GPx**	GSH-Rx**
L-serina	0.6 \pm 0.07	15.2 \pm 1.3	0.044 \pm 0.004	0.056 \pm 0.007
D-serina	0.4 \pm 0.05 [#]	16.0 \pm 1.2	0.045 \pm 0.003	0.060 \pm 0.005
SnCl ₂ +D-serina	0.4 \pm 0.06 [#]	15.8 \pm 1.3	0.042 \pm 0.007	0.061 \pm 0.004

* k/mg proteína. ** U/mg proteína. Valores: $\bar{x} \pm$ EEM. [#]p<0.001 vs L-serina.

Con esto, se confirmó que la administración de D-serina provoca insuficiencia renal que no se modifica al administrar inductor de la HO-1. La insuficiencia tampoco parece estar acompañada de daño oxidativo, ni de modificación del sistema antioxidante en el riñón, ya que el único componente antioxidante que disminuye su actividad es la catalasa, enzima encargada de decomponer H₂O₂.

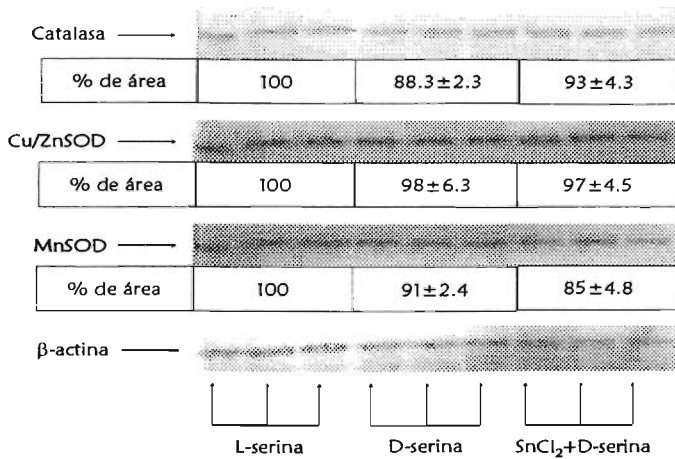


Fig. 52. Expresión de catalasa, Cu/Zn-SOD y Mn-SOD evaluada mediante western blot en el esquema 3.

Como hasta este momento no se encontró indicio de daño oxidativo, nos preguntamos si el estrés nitrosativo estaría involucrado en la nefrotoxicidad por D-serina. Para explorar esta posibilidad se determinó la excreción urinaria de nitritos y nitratos, los metabolitos finales del ON[•]. Se utilizaron muestras de orina de los animales tratados con 400 mg/Kg de D-serina y sus respectivos controles (Fig. 53). Interesantemente, la excreción urinaria de nitritos y nitratos es significativamente menor en el grupo tratado con D-serina, lo cual indica que este aminoácido provocó cambios en el metabolismo del ON[•], sugiriendo que el estrés nitrosativo podría estar participando en la nefrotoxicidad por D-serina.

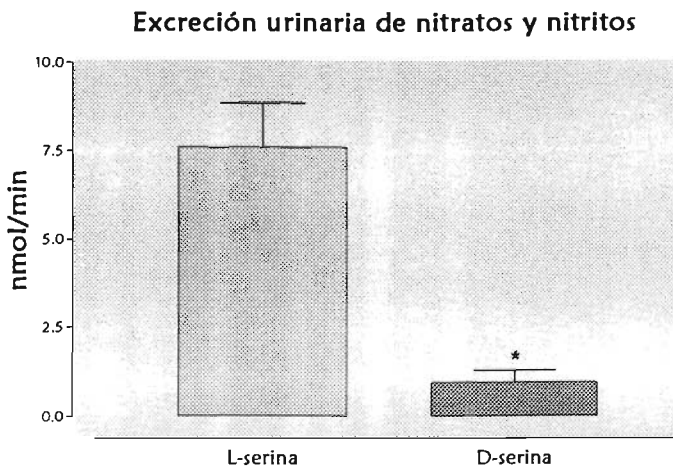


Fig. 53. Excreción urinaria de nitritos y nitratos al administrar 400 mg/Kg del aminoácido indicado.

DISCUSIÓN

En los últimos años se demostró que la D-serina es un agonista endógeno del sitio de glicina en el NMDAr. Dado que este receptor y la disminución en los niveles de D-serina se han implicado en la patofisiología de la esquizofrenia, se ha estudiado el papel terapéutico de la D-serina en pacientes esquizofrénicos. Así, se ha encontrado que los síntomas de la esquizofrenia disminuyen en personas sometidas a tratamiento con antipsicóticos más D-serina (Tsai *et al.*, 1998; Heresco-Levy *et al.*, 2005). Por tanto, la D-serina se perfila como una estrategia terapéutica para pacientes esquizofrénicos. Sin embargo, un efecto bien conocido de este D-aminoácido es su nefrotoxicidad (Carone y Ganote, 1975; Carone *et al.*, 1985; Silbernagl *et al.*, 1997; Silbernagl *et al.*, 1999).

A pesar de que la nefrotoxicidad inducida por D-serina es un efecto conocido desde hace más de medio siglo, aún no se conoce el mecanismo por el que este D-aminoácido produce daño. Se sabe que la administración de D-serina, pero no la de L-serina, en roedores provoca pérdida de peso, incremento del volumen urinario, proteinuria, glucosuria y aminoaciduria dentro de las primeras horas, efectos que remiten a los 6 días (Carone y Ganote, 1975; Carone *et al.*, 1985). La ocurrencia de estos efectos coincide con la necrosis que se ha encontrado mediante el análisis histológico de la porción recta del túbulo proximal. En el túbulo proximal se determinó la presencia de un transportador con baja estereoespecificidad, el cual es mediador de la reabsorción de la D-serina (Silbernagl *et al.*, 1999).

Una vez que la D-serina entra en la porción recta del túbulo proximal, es metabolizada por la ODA, reacción en donde se produce H_2O_2 (Pilone, 2000). Al ser este compuesto una ERO, y sustrato de la reacción de Fenton, su producción ha llevado a suponer que el estrés oxidativo podría estar involucrado en el mecanismo de la nefrotoxicidad por D-serina. Esta suposición se apoya en el hecho de que el estrés oxidativo está involucrado en el mecanismo de otros compuestos nefrotóxicos, como son cisplatina (Somani *et al.*, 1995; Matsushima *et al.*, 1998), $K_2Cr_2O_7$ (Bagchi *et al.*, 1995; Liu y Shi, 2001), ciclosporina A (Serino *et al.*, 1994; Haberland *et al.*, 1997) y gentamicina (Walker *et al.*, 1999; Cuzzocrea *et al.*, 2002), entre otros.

Sin embargo, hasta la fecha sólo un trabajo publicado como resumen sugiere la participación del estrés oxidativo posterior a la administración de D-serina. En dicho trabajo se indica que la D-serina provoca una depleción de glutatión y aminoaciduria, efectos que se previnieron al coadministrar glutatión reducido (Silbernagl *et al.*, 1997).

Vale la pena mencionar que dicho reporte no ofrece comparación estadística, y tampoco menciona marcadores de daño oxidativo a macromoléculas.

Por lo tanto, es necesario reunir mayor evidencia para demostrar si el estrés oxidativo está implicado en la nefrotoxicidad de la D-serina, además de investigar si estrategias de protección útiles en otros modelos de nefrotoxicidad (como la inducción de HO-1) atenúan la nefrotoxicidad por D-serina.

Por otra parte, la HO-1 es una enzima de 32 kDa que cataliza la degradación del grupo hemo a CO, Fe²⁺ y biliverdina, y esta última se convierte a bilirrubina por la biliverdina reductasa. La HO-1 se induce por una gran variedad de estímulos prooxidantes, tales como el grupo hemo, la radiación UV, los metales pesados, la hiperoxia y diversos compuestos nefrotóxicos asociados con el estrés oxidativo. Por ejemplo, cisplatina (Agarwal *et al.*, 1995), K₂Cr₂O₇ (Barrera *et al.*, 2003), ciclosporina (Galletti *et al.*, 2005) y glicerol (Nath *et al.*, 1992). En estos modelos, además, la sobreexpresión de la HO-1 tiene un efecto citoprotector. En la nefrotoxicidad por gentamicina, también se induce la HO-1 (Agarwal *et al.*, 1995), pero no se ha comprobado si su sobreexpresión tiene un papel protector.

Para determinar si el estrés oxidativo participa en un modelo, se buscan evidencias de oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Adicionalmente, en diferentes modelos, la expresión de la HO-1 también se ha utilizado ampliamente como un marcador de estrés oxidativo (Miwa *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2005). Tomando en cuenta todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue estudiar tanto el papel de la HO-1 como estrategia de prevención, como la participación del estrés oxidativo en la nefrotoxicidad inducida por D-serina.

Al estudiar dentro de las primeras 24 horas el curso temporal de la nefrotoxicidad por D-serina con una dosis única de 400 mg/Kg, encontramos que la administración de D-serina, provocó el aumento, con respecto al tiempo, de las concentraciones de creatinina en suero y BUN, lo cual indica que la insuficiencia renal se presentó en forma progresiva dentro de las 24 horas posteriores a la administración de D-serina. Sin embargo, no se detectó la expresión de HO-1 en el grupo control ni en ninguno de los tiempos estudiados, tampoco hubo cambio significativo en los niveles de MDA y proteínas oxidadas. Respecto a la actividad de enzimas antioxidantes, no se detectó cambio significativo en ninguno de los tiempos estudiados. Contrario a lo reportado por Silbernagl y col. (1997), la administración de D-serina no se acompañó por depleción de GSH.

Cuando se administraron 400 mg/Kg de D-serina, la insuficiencia renal evaluada mediante proteinuria y glucosuria a las 24 horas es consistente con datos reportados previamente (Carone y Ganote, 1975). El grupo control fue tratado con la misma dosis de L-serina.

El resto de los marcadores de insuficiencia renal: BUN, creatinina, depuración de creatinina, actividad de NAG en orina y reabsorción tubular de agua, también apuntaron en el sentido de que la D-serina, pero no la L-serina, causó nefrotoxicidad. Se estudiaron otros dos grupos en este esquema para determinar el papel de la HO-1 en la nefrotoxicidad inducida por D-serina. Los grupos se trataron con i) inductor (SnCl_2) de HO-1 e ii) inductor más inhibidor ($\text{SnCl}_2 + \text{SnMP}$) de la enzima, además ambos grupos se trataron también con D-serina. Se comprobó por western blot que la HO-1 se expresó en estos dos grupos, y no en el grupo donde se administró sólo D-serina ni en el grupo con L-serina.

La insuficiencia renal de los grupos tratados con SnCl_2 y $\text{SnCl}_2 + \text{SnMP}$ fue estadísticamente igual al del grupo con D-serina, es decir, ni la preinducción ni la inhibición de HO-1 modificó la nefrotoxicidad inducida por el D-aminoácido. En cuanto a los marcadores de daño oxidativo, no se detectó diferencia significativa entre ninguno de los cuatro grupos al cuantificar MDA. Al cuantificar proteínas oxidadas, tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos problema y el grupo control a pesar de que los grupos de SnCl_2 y $\text{SnCl}_2 + \text{SnMP}$ más D-serina son diferentes entre sí. La expresión de enzimas antioxidantes no se afectó en ninguno de los grupos. La actividad de todas las enzimas antioxidantes que se evaluaron es la misma entre el grupo D-serina y el grupo L-serina. También se encontraron algunas diferencias en la actividad de catalasa, GPx y SOD de los grupos tratados con SnCl_2 y $\text{SnCl}_2 + \text{SnMP}$ más D-serina respecto al control. Los mecanismos de estos cambios no están claros y se requieren experimentos adicionales para dilucidarlos.

Tomando en cuenta que no se encontró evidencia de daño oxidativo en lípidos y proteínas y menos aún la inducción de HO-1, que también se utiliza como marcador de estrés oxidativo, nuestros datos sugieren que el estrés oxidativo no está involucrado en la nefrotoxicidad inducida por D-serina. Este resultado es interesante debido a que como se mencionó antes, en los modelos de nefrotoxicidad más estudiados, el estrés oxidativo juega un papel importante y generalmente la inducción de HO-1 ha tenido un papel protector.

En varios de los trabajos reportados, la insuficiencia renal por D-serina se provocó mediante una dosis única de 800 mg/Kg de D-serina (Silbernagl *et al.*, 1997; Silbernagl *et al.*, 1999).

Como en nuestro laboratorio se comprobó que dosis menores también son nefrotóxicas y que una dosis de 400 mg/Kg no induce pérdida de peso 24 horas después, se eligió dicha dosis para iniciar este trabajo. Dado que los resultados indicaron la ausencia de estrés oxidativo y de la expresión de HO-1 con esa dosis de D-serina, se decidió estudiar el efecto de una dosis mayor (800 mg/Kg) sobre los marcadores de estrés oxidativo. Al mismo tiempo, se estudió el papel de la HO-1 en la insuficiencia renal inducida por la dosis alta de D-serina.

Inicialmente, se evaluaron los marcadores de disfunción renal BUN, creatinina en suero, depuración de creatinina, proteinuria, glucosuria, actividad de NAG en orina y se calculó la reabsorción tubular de agua. Todos estos marcadores fueron consistentes al indicar que la L-serina no provocó insuficiencia renal, pero sí la D-serina. En cuanto al SnCl_2 , cinco de los siete marcadores indicaron que este compuesto no previene la insuficiencia renal inducida por D-serina. De los dos marcadores restantes uno indicó protección y el otro indicó aumento de disfunción. Por tanto, el conjunto de datos señalan que la preinducción de la HO-1 no previene la insuficiencia renal inducida por D-serina.

Respecto a los marcadores de daño oxidativo, no se encontraron diferencias en la concentración de MDA ni de proteínas oxidadas en ninguno de los tres grupos tratados. Además, la D-serina no indujo cambios en la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, con excepción de la catalasa. La D-serina disminuyó su actividad pero no modificó su expresión. En conjunto, todos los datos obtenidos en este trabajo sugieren que el estrés oxidativo no está implicado y la HO-1 no tiene un papel protector en la nefrotoxicidad por D-serina, al menos en las condiciones estudiadas.

Como no se encontró indicio de daño oxidativo, surgió la pregunta de si el estrés nitrosativo estaría relacionado con la nefrotoxicidad por D-serina. Para explorar esta posibilidad se determinó la excreción de los metabolitos finales del ON^* en orina de los animales tratados con 400 mg/Kg de D-serina y sus respectivos controles. Interesantemente, la excreción de nitritos y nitratos en el grupo tratado con D-serina (400 mg/Kg) resultó menor que en sus respectivos controles. La disminución de la producción de nitritos y nitratos puede ser consecuencia de una disminución de la producción de ON^* , posiblemente como consecuencia de una disminución de la actividad de las sintetas de ON^* , o también puede deberse a que el ON^* se esté metabolizando a especies reactivas de nitrógeno las cuales pueden estar nitrando proteínas. Esto abre la posibilidad a que el estrés nitrosativo participe en la nefrotoxicidad por D-serina, y deja como perspectivas la determinación de marcadores de estrés nitrosativo, como proteínas nitradas.

CONCLUSIONES

- ✓ La administración de D-serina no induce la expresión de la HO-1.
- ✓ La inducción de la HO-1 no atenúa la nefrotoxicidad por D-serina.
- ✓ La inhibición de la HO-1 no exagera la nefrotoxicidad inducida por D-serina.
- ✓ La administración de D-serina no modifica marcadores de daño oxidativo (MDA y proteínas oxidadas).
- ✓ La D-serina no afecta significativamente la cantidad de proteína ni la actividad de las enzimas antioxidantes SOD total, GPx y GSH-Rx. Tampoco modifica la cantidad de proteína pero si la actividad de la enzima antioxidante catalasa.
- ✓ El estrés oxidativo parece no estar involucrado en la nefrotoxicidad inducida por D-serina.

PERSPECTIVAS

Estudiar respecto al mecanismo de nefrotoxicidad por D-serina:

¿Se modifican los marcadores de estrés oxidativo en tiempos mayores de exposición al aminoácido?

Si no hay evidencia de estrés oxidativo, ¿la hay de estrés nitrosativo?

¿Cómo se encuentra la nitración de proteínas? ¿Y la actividad de las sintasas de ON*?

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham N, Botros F, Rezzani R, Rodella L, Bianchi R, Goodman A. 2002. Differential effect of cobalt protoporphyrin on distributions of heme oxygenase in renal structure and on blood pressure in SHR. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48:895-902.
2. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6.
3. Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. 1995. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 48:1298-307.
4. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. 1999. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 104:1631-9.
5. Bagchi D, Hassoun EA, Bagchi M, Stohs SJ. 1995. Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in Sprague-Dawley rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 110:177-87.
6. Barañano D, Rao M, Ferris C, Zinder S. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16093-8.
7. Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$. *Free Radic Biol Med* 34:1390-8.
8. Berberat PO, A-Rahim YI, Yamashita K, Warny MM, Csizmadia E, Robson SC, Bach FH. 2005. Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 11:350-9.
9. Bruckner H, Hausch M. 1993. Gas chromatographic characterization of free D-amino acids in the blood serum of patients with renal disorders and of healthy volunteers. *J Chromatogr* 614:7-17.
10. Cable E, Gildemeister O, Pepe J, Lambrecht W, Bonkovsky H. 1997. Mechanism of induction of heme oxygenase by metalloporphyrins in primary chick embryo liver cells: Evidence against a stress-mediated response. *Mol Cell Biochem* 169:13-20.
11. Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250:5475-80.
12. Carone FA, Ganote CE. 1975. D-serine nephrotoxicity. The nature of proteinuria, glucosuria, and aminoaciduria in acute tubular necrosis. *Arch Pathol* 99:658-62.
13. Carone FA, Nakamura S, Goldman B. 1985. Urinary loss of glucose, phosphate and protein by diffusion into proximal straight tubules injured by D-serine and maleic acid. *Lab Invest* 52:605-10.
14. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. 2002. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 39:269-74.
15. Chen K, Gunter K, Maines MD. 2000. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. *J Neurochem* 75:304-13.
16. Choi B, Pae H, Jeong Y, Oh G, Jun C, Kim B, Kim Y, Chung H. 2004. Overexpression of heme oxygenase (HO)-1 renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radic Biol Med* 36:858-71.
17. Cosso L, Maineri EP, Traverso N, Rosatto N, Pronzato MA, Cottalasso D, Marinari UM, Odetti P. 2001. Induction of heme oxygenase 1 in liver of spontaneously diabetic rats. *Free Radic Res* 34:189-91.
18. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, De Sarro A, Pierpaoli S, Caputi A, Masini E, Salvemini D. 2002. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 450:67-76.
19. De Miranda J, Santoro A, Engelender S, Wolosker H. Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis. *Gene* 256:183-8.
20. Dhar GJ, Bossenmaier I, Cardinal R, Petryka ZJ, Watson CJ. 1978. Transitory renal failure following rapid administration of a relatively large amount of hematin in a patient with acute intermittent porphyria in clinical remission. *Acta Med Scand* 203:437-43.
21. Dudnik LB, Tsyupko AN, Khrenov AV, Alessenko AV. 2001. Effect of bilirubin on lipid peroxidation, sphingomyelinase activity, and apoptosis induced by sphingosine and UV irradiation. *Biochemistry (Mosc)* 66:1019-27.
22. Dunlop D, Neidle A. 1997. The origin and turnover of D-serine in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 235:26-30

23. Evans P, Halliwell B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 85:567-74.
24. Fishman WH, Artom C. 1942. Serine injury. *J Biol Chem* 145:345-6.
25. Fukuda K, Richmon JD, Sato M, Sharp FR, Panter SS, Noble LJ. 1996. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in glia after traumatic brain injury. *Brain Res* 736:68-75.
26. Galbraith R. 1999. Heme oxygenase: Who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* 222:299-305.
27. Galletti P, Iolanda Di Gennaro C, Migliardi V, Indaco S, Della Ragione F, Manna C, Chiodini P, Capasso G, Zappia V. 2005. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant*, en prensa.
28. Ganote CE, Peterson DR, Carone FA. 1974. The nature of D-serine--induced nephrotoxicity. *Am J Pathol* 7:269-82.
29. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 11:1176-83.
30. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-8.
31. Griffith OW. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207-12.
32. Grosser N, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A, Schroder H. 2004. Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 314:351-5.
33. Gwinner W, Deters-Evers U, Brandes RP, Kubat B, Koch KM, Pape M, Olbricht CJ. 1998. Antioxidant-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney. *J Physiol* 509:599-606.
34. Haberland A, Henke W, Grune T, Siems W, Jung K, Schimke I. 1997. Differential response of oxygen radical metabolism in rat heart, liver and kidney to cyclosporine A treatment. *Inflamm Res* 46:452-4.
35. Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716.
36. Halliwell B, Gutteridge J. 1999. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. Oxford, University Press. USA. Pág. 48-94.
37. Hashimoto A, Oka T. 1997. Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol* 52:325-53.
38. Haugen EN, Croatt AJ, Nath KA. 2000. Angiotensin II induces renal oxidant stress in vivo and heme oxygenase-1 in vivo and in vitro. *Kidney Int* 58:144-52.
39. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ebsstein R, Vass A, Lichtenberg P, Bar G, Catinari S, Ermilov M. 2005. D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biol Psychiatry* 57:577-85.
40. Hiasa Y, Enoki N, Kitahori Y, Konishi N, Shimoyama T. 1984. DL-Serine: promoting activity on renal tumorigenesis by N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine in rats. *J Natl Cancer Inst* 73:297-9.
41. Imai K, Fukushima T, Santa T, Homma H, Huang Y, Shirao M, Miura K. 1998. Whole body autoradiographic study on the distribution of 14C-D-serine administered intravenously to rats. *Amino Acids* 15:351-61.
42. Immenschuh S, Ramadori G. 2000. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 60:1121-8.
43. Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. 1975. New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 21:1136-40.
44. Kaltenbach JP, Ganote CE, Carone FA. 1979. Renal tubular necrosis induced by compounds structurally related to D-serine. *Exp Mol Pathol* 30:209-14.
45. Kanakiriya S, Nath K. 2001. Heme oxygenase and acute renal injury. En: *Acute Renal Failure*. Molitoris, B & Fina, W. (Eds). W. B. Saunders Company.
46. Kappas A, Maines MD. 1976. Tin: a potent inducer of heme oxygenase in kidney. *Science*. 192:60-2.
47. Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito A, Lyer S, Southard D, Busuttill R, Kupiec-Weglinski J. 2002. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 73:287-92.
48. Kone BC. 1999. Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol* 19:230-41.
49. Kragh-Hansen U, Sheikh MI. 1984. Serine uptake by luminal and basolateral membrane vesicles from rabbit kidney. *J Physiol* 354:55-67.

50. Kuhn H, Borchert A. 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 33:154-72.
51. Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM, Organisciak DT. 1995. Induction of heme oxygenase I in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1177-81.
52. Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-8.
53. Levere RD, Staudinger R, Loewy G, Kappas A, Shibahara S, Abraham NG. 1993. Elevated levels of heme oxygenase-I activity and mRNA in peripheral blood adherent cells of acquired immunodeficiency syndrome patients. *Am J Hematol* 43:19-23.
54. Le W, Xie W, Appel SH. 1999. Protective role of heme oxygenase-I in oxidative stress-induced neuronal injury. *J Neurosci Res* 56:652-8.
55. Liu KJ, Shi X. 2001. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222:41-47.
56. Liu LG, Yan H, Zhang W, Yao P, Zhang XP, Sun XF, Nussler AK. 2004. Induction of heme oxygenase-I in human hepatocytes to protect them from ethanol-induced cytotoxicity. *Biomed Environ Sci* 17:315-26.
57. Makino N, Suematsu M, Sugiura Y, Morikawa H, Shiomi S, Goda N, Sano T, Nimura Y, Sugimachi K, Ishimura Y. 2001. Altered expression of heme oxygenase-I in the livers of patients with portal hypertensive diseases. *Hepatology* 33:32-42.
58. Matés J, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.
59. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. 1998. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 131:518-26.
60. Matsuoka Y, Okazaki M, Kitamura Y. 1999. Induction of inducible heme oxygenase (HO-1) in the central nervous system: is HO-1 helpful or harmful? *Neurotox Res* 1:113-7.
61. Miwa H, Kubo T, Morita S, Nakanishi I, Kondo T. 2004. Oxidative stress and microglial activation in substantia nigra following striatal MPP+. *Neuroreport* 15:1039-44.
62. Morse D, Choi A. 2002. Heme oxygenase-I. The "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:8-16.
63. Muse KE, Oberley TD, Sempf JM, Oberley LW. 1994. Immunolocalization of antioxidant enzymes in adult hamster kidney. *Histochem J* 26:734-53.
64. Nagata Y, Akino T, Ohno K, Kataoka Y, Ueda T, Sakurai T, Shiroshita K, Yasuda T. 1987 Free D-amino acids in human plasma in relation to senescence and renal diseases. *Clin Sci* 73:105-8.
65. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. 1992. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90:267-70.
66. Nath K, Haggard J, Croatt A, Grande J, Poss K, Alam J. 2000. The indispensability of heme oxygenase-I in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 156:1527-35.
67. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, Haggard JJ, Croatt AJ, Payne WD, Alam J. 2001. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-I. *Kidney Int* 59:106-17.
68. Oberley LW, Spitz DR. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-64.
69. Olinescu R, Smith TL. 2002. Free radicals in Medicine. New York, Nova Science Publishers, Inc. Pág. 87-118.
70. Pawelczyk T, Bizon D, Angielski S. 1992. The distribution of enzymes involved in purine metabolism in rat kidney. *Biochim Biophys Acta* 1116:309-14.
71. Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Bobadilla N. 1992. Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the spin-trapping agent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Ren Fail* 14:467-71.
72. Pilone MS. 2000. D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci* 57:1732-47.
73. Pollegioni L, Caldinelli L, Molla G, Sacchi S y Pilone M. 2004. Catalytic properties of D-amino acid oxidase in cephalosporin C bioconversion: a comparison between proteins from different sources. *Biotechnol Prog* 20:467-73.
74. Ponka P. 1999. Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 318:241-56.

75. Poss K, Tonegawa S. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase-I deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10925-30.
76. Quan S, Kaminski P, Yang L, Morita T, Inaba M, Ikehara S, Goodman A, Wolin M, Abraham N. 2004. Heme oxygenase-I prevents superoxide anion-associated endothelial cell sloughing in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 315:509-16.
77. Raab W, Hohenegger M, Kaiser E. 1969. Nephrotoxic action of D-serine determined by renal enzyme excretion in rats. *Pharmacology* 2:82-8.
78. Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 233:357-63.
79. Rezzani R, Rodella L, Buffoli B, Goodman AA, Abraham NG, Lianos EA, Bianchi R. 2005. Change in renal heme oxygenase expression in cyclosporine A-induced injury. *J Histochem Cytochem* 53:105-12.
80. Rhodin JAG. 1971. Structure of the kidney. 2a ed. En: *Diseases of the kidney*. Strauss, MB & Welt, LG. (Eds). Little Brown and Co. Boston. Pág. 35-80.
81. Rovin BH, Würst E, Kohan DE. 1990. Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int* 37:1509-14.
82. Rytter S, Tyrrel R. 1997. The role of heme oxygenase-I in the mammalian stress response: Molecular aspects of regulation and function. In: *Oxidative stress and signal transduction*. Forman H, Cadenas E. (Eds) Chapman & May. International Thomson Publishing.
83. Scapagnini G, Agata V, Calabrese V, Pascale A, Colombrita C, Alkon D, Cavallaro S. 2002. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain. *Brain Res* 954:51-9.
84. Schipper H, Cisse S, Stopa E. 1995. Expression of heme oxygenase-I in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann Neurol* 37:758-68.
85. Schipper H, Liberman A, Stopa E. 1998. Neural heme oxygenase-I expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 150:60-8.
86. Serino F, Grevel J, Napoli KL, Kahan BD, Strobel HW. 1994. Oxygen radical formation by the cytochrome P450 system as a cellular mechanism for cyclosporine toxicity. *Transplant Proc* 26:2916-7.
87. Shah SV. 1989. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 35:1093-106.
88. Silbemergl S, O'Donovan DJ, Völker, K. 1997. D-serine nephrotoxicity is mediated by oxidative damage. *Pflüegers Arch* 433:R37 (Resumen).
89. Silbemergl S, Volker K, Dantzer WH. 1999. D-Serine is reabsorbed in rat renal pars recta. *Am J Physiol* 276:F857-63.
90. Somani SM, Ravi R, Rybak LP. 1995. Diethyldithiocarbamate protection against cisplatin nephrotoxicity: antioxidant system. *Drug Chem Toxicol* 18:151-70.
91. Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. 2004. Heme oxygenase-I: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. *Curr Med Chem* 11:1545-61.
92. Tisher CC, Madsen KM. 2000. Anatomy of the kidney. En: *The kidney*. Brenner BM & Rector FC Jr Brenner (eds). Saunders Co. Philadelphia. Pág. 3-67.
93. Toda N, Takahashi T, Mizobuchi S, Fujii H, Nakahira K, Takahashi S, Yamashita M, Morita K, Hirakawa M, Akagi R. 2002. Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 30:1512-22.
94. Tojo A, Chabrashvili T, Kitiyakara C, Wilcox CS. 1999. Expression and distribution of the five components of the classic NADPH oxidase in the kidney: comparison of SHR and WKY. *J Am Soc Nephrol* 10:343A (Resumen)
95. Tomaro M, Battle A. 2002. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 34:216-20.
96. Tsai G, Yang P, Chung L, Lange N, Coyle J. 1998. D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44:1081-9.
97. Tsai GE, Yang P, Chung LC, Tsai IC, Tsai CW, Coyle JT. 1999. D-serine added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 156:1822-5.
98. Urso M, Clarkson P. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189:41-54.
99. Van den Munckhof RJ. 1996. In situ heterogeneity of peroxisomal oxidase activities: an update. *Histochem J* 28:401-29.

100. Vogt BA, Shanley TP, Croatt A, Alam J, Johnson KJ, Nath KA. 1996. Glomerular inflammation induces resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase-dependent resistance to renal injury. *J Clin Invest* 98:2139-45.
101. Wachstein M. 1947. Nephrotoxic action of dl-serine in the rat. Localization of the renal damage, the phosphatase activity and the influence of age, sex, time and dose. *Arch Pathol* 43:503-14.
102. Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG. 2003. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 55:551-71.
103. Walker PD, Barri Y, Shah SV. 1999. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* 21:433-42.
104. Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN, Cho CH. 2001. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G586-94.
105. Wang LZ, Zhu XZ. 2003. Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development. *Acta Pharmacol Sin* 24:965-74.
106. Wang XH, Wang K, Zhang F, Li XC, Li J, De W, Guo J, Qian XF, Fan Y. 2005. Heme oxygenase-1 alleviates ischemia/reperfusion injury in aged liver. *World J Gastroenterol* 11:690-4.
107. Waring W, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb D, Maxwell S. 2003. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci* 105:425-30.
108. Wolosker H, Sheth K, Takahashi M, Mothet J, Brady R, Ferris C, Snyder S. 1999. Purification of serine racemase: Biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:721-5.
109. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103:129-35.
110. Yan XD, Kumar B, Nahreini P, Hanson AJ, Prasad JE, Prasad KN. 2005. Prostaglandin-induced neurodegeneration is associated with increased levels of oxidative markers and reduced by a mixture of antioxidants. *J Neurosci Res* 81:85-90.
111. Zou AP, Li N, Cowley AW Jr. 2001. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension* 37:547-53.