



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE EN
LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA
EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAOLA YAM CANUL



MÉXICO, D.F.

2007



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.

El jurado asignado:

PRESIDENTE: Blas Lotina Hennsen

VOCAL: Sobeida Sánchez Nieto

SECRETARIO: José Pedraza Chaverrí

1er. SUPLENTE: Gloria Gutiérrez Venegas

2do. SUPLENTE: Ma. Benita Leonor Fernández Salgado

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 209, 2º piso, edificio "F" de la Facultad de Química de la UNAM, México DF.

Este trabajo de investigación recibió apoyo del CONACYT (Proyecto No. 40009 M) y

DGAPA (Proyecto No. IN227103).

Asesor: Dr. José Pedraza Chaverrí

Supervisor técnico: QFB Yolanda Irasema Chirino López

Sustentante: Paola Yam Canul

“Las grandes obras del hombre no se han logrado de la noche a la mañana, requieren dedicación, trabajo duro y sobretodo constancia”

“Cuando sueñas en lo que quieres una y otra vez, estás creando los planos de lo que quieres construir y el mapa a donde quieres ir”

En primer lugar le dedico este trabajo a DIOS. Gracias a él he logrado terminar una etapa más de mi vida, él siempre ha estado conmigo y me ha dado las fuerzas para seguir adelante.

A mi familia. A mi mamá María Canul, por su comprensión y ayuda y a mi papá Marcelino Yam le agradezco su apoyo a lo largo de toda la carrera. A mi hermano Rafael por ser un gran amigo con el que he compartido muchas experiencias agradables.

Le agradezco al Dr. Pedraza por haberme aceptado en su laboratorio y haberme apoyado en todos los aspectos, de él aprendí que en la vida hay muchas oportunidades que a veces dejamos pasar y no aprovechamos, que hay que vivir al máximo y aprender de todas las experiencias malas o buenas y que en esta vida hay tantas cosas positivas como negativas. Y es mi decisión en cual de las dos enfocarme.

Le doy las gracias a Irasema primero por adoptarme como su hija y segundo por haberme transmitido un poco de su sabiduría, por sus consejos y por enseñarme que la práctica hace al maestro y que el genio consiste en 1% de inspiración y 99% de transpiración.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio que hicieron mi estancia en el laboratorio agradable: a Omar que me enseñó a poner atención en mi trabajo y así evitar un gran porcentaje de accidentes, a Marisol por sus consejos y regaños, ambos me enseñaron que cuando tuviera algún problema, el comentarlo con las personas que tienen más experiencia, me brindarían su ayuda la cual era invaluable, a Sabina por que con ella compartí momentos inolvidables en el bioterio y gracias a eso nos volvimos grandes amigas y aprendí que dos cabezas piensan mejor que una, a Octavio por su ayuda y su amistad y a Tino que siempre me animaba a seguir adelante y por haberme adoptado en nutrición.

Por último quiero agradecerle a Marco una persona que ha formado parte de mi vida, él siempre me ayudo en todo momento, siempre me apoyo, siempre me esperaba a la hora de la salida, siempre estaba pendiente de mi y de mi trabajo. Le agradezco por su paciencia y su confianza, sus consejos que siempre me fueron útiles, por sus regaños también y por compartir conmigo muchos momentos tristes y alegres.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química, mi segundo hogar, a mis compañeros y compañeras principalmente a América, Lili y Lulú por haberme pasado las tareas y por haber compartido las malas calificaciones, las presiones de los maestros y de los exámenes, pero también por ser muy buenas amigas.

SIEMPRE PUMA DE CORAZÓN.

TABLA DE CONTENIDO

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	4
1.1. Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)	4
1.2. Uso industrial	4
1.3. Toxicidad	4
1.4. Generalidades del riñón	6
1.4.1. Unidad funcional	7
1.4.2. Insuficiencia renal aguda (IRA)	8
1.4.3. IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$	9
1.5. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	10
1.5.1. Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	11
1.5.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	12
1.5.3. Radical hidroxilo (OH^{\bullet})	12
1.5.4. Oxígeno singulete (1O_2)	12
1.6. Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	13
1.6.1. Óxido nítrico (NO^{\bullet})	13
1.6.2. Peroxinitrito ($ONOO^-$)	13
1.6.3. Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet})	13
1.7. Estrés oxidativo	13
1.7.1. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas	14
1.7.2. Estrés oxidativo y enfermedad	14
1.7.3. Estrés oxidativo y nefrotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$	15
1.8. Mecanismos de defensa antioxidantes	17
1.8.1. Antioxidantes enzimáticos	18
1.8.2. Antioxidantes no enzimáticos	18
1.8.3. Antioxidantes y la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$	19
1.9. Ajo	20
1.9.1. Propiedades antioxidantes	21
1.9.2. Ajo en polvo	22
1.10. Ácido nordihidroguayarético (NDGA)	25
1.10.1. Actividad antioxidante	26
1.11. Poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP)	28
1.11.1. <i>N</i> -(6-Oxo-5,6-dihidrofenantridina-2-il)- <i>N,N</i> -dimetilacetamida:HCl] (PJ34) como inhibidor de la PARP	30
<u>2. JUSTIFICACIÓN</u>	34
<u>3. HIPÓTESIS</u>	34
<u>4. OBJETIVO GENERAL</u>	35
<u>5. OBJETIVOS PARTICULARES</u>	35
<u>6. METODOLOGÍA</u>	36
6.1. Reactivos y equipo	36
6.2. Animales y estrategia experimental	37
6.3. Tratamiento de los animales y obtención de las muestras	37
6.4. Tratamiento de las muestras	39
6.5. Determinaciones	41
6.6. Evaluación de la función renal	41
6.6.1. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	41
6.6.2. Concentración de creatinina en suero	42

6.6.3. Proteinuria	42
6.6.4. Actividad de N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en orina	43
6.6.5. Actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en suero	43
6.6.6. Excreción urinaria de glutatión S-transferasa (GST)	44
6.6.7. Histología	46
6.7. Evaluación del daño oxidativo	46
6.7.1. Lipoperoxidación	46
6.7.2. Contenido de grupos carbonilo en proteínas	47
6.7.3. Cuantificación de 3-nitrotirosina (3-NT), 4-hidroxinonenal (4-HNE) y poli (ADP-ribosa) (pADPr) por inmunohistoquímica	48
6.8. Análisis estadístico	49
<u>7. RESULTADOS</u>	50
7.1. Efecto de la alimentación con una dieta suplementada con ajo en al 2% sobre la IRA inducida con K ₂ Cr ₂ O ₇	50
7.1.1. Peso corporal y volumen urinario	50
7.1.2. Evaluación de la función renal	50
7.1.3. Histología	52
7.1.4. Cuantificación del área tubular dañada	52
7.1.5. Evaluación del daño oxidativo	53
7.1.6. Inmunohistoquímica	53
7.2. Efecto del tratamiento con NDGA sobre la IRA inducida con K ₂ Cr ₂ O ₇	55
7.2.1. Peso corporal y volumen urinario	55
7.2.2. Evaluación de la función renal	55
7.2.3. Histología	56
7.2.4. Cuantificación del área tubular dañada	56
7.2.5. Evaluación del daño oxidativo	58
7.2.6. Inmunohistoquímica	58
7.3. Efecto del tratamiento con PJ34 sobre la IRA inducida con K ₂ Cr ₂ O ₇	58
7.3.1. Peso corporal y volumen urinario	58
7.3.2. Evaluación de la función renal	58
7.3.3. Histología	59
7.3.4. Cuantificación del área tubular dañada	61
7.3.5. Evaluación del daño oxidativo	61
7.3.6. Inmunohistoquímica	62
<u>8. DISCUSIÓN</u>	64
8.1. Efecto de la alimentación con una dieta suplementada con ajo en polvo al 2% sobre la IRA inducida con K ₂ Cr ₂ O ₇	64
8.2. Efecto del tratamiento con NDGA sobre la IRA inducida con K ₂ Cr ₂ O ₇	67
8.3. Efecto del tratamiento con PJ34 sobre la IRA inducida con K ₂ Cr ₂ O ₇	68
<u>9. CONCLUSIONES</u>	70
<u>10. REFERENCIAS</u>	71

RESUMEN

El dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) es empleado en la industria química, metalúrgica y refractaria. El contacto directo con el $K_2Cr_2O_7$ puede producir quemaduras y ulceraciones; su inhalación produce irritación, lesiones y perforaciones en las mucosas de las vías respiratorias; la ingestión de alimentos o agua contaminados produce diarreas, vómito y espasmos. La solubilidad del $K_2Cr_2O_7$ permite que se absorba rápidamente por ingestión, por contacto dérmico y por inhalación, siendo estas dos últimas las vías principales de absorción en la exposición ocupacional. Cuando el $K_2Cr_2O_7$ atraviesa la membrana celular de los glóbulos rojos, se une a la fracción globina de la hemoglobina, depositándose luego en el hígado y en el riñón afectando la función de ambos órganos y produciendo lesiones reversibles como la insuficiencia renal aguda (IRA). El mecanismo por el cual el $K_2Cr_2O_7$ induce IRA involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, estos efectos del $K_2Cr_2O_7$ han servido como modelo de estudio de enfermedades asociadas con IRA. Por otra parte, la producción excesiva de ERO, la disminución en la capacidad antioxidante o una combinación de ambas, se conoce como estrés oxidativo. Bajo estas condiciones, las ERO pueden causar alteraciones a biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos lo cual, en casos muy severos, puede conducir a la muerte celular. En la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$, el tratamiento con antioxidantes como la vitamina E, el ácido ascórbico y el glutatión previenen los eventos nefrotóxicos.

El daño al ADN causado por las ERO puede activar a la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), una enzima nuclear que cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa procedentes del sustrato adenina dinucleótido de nicotinamida (NAD^+) sobre una serie de proteínas nucleares responsables de reparar el daño al ADN. La sobreactivación de la PARP provoca daños celulares severos, por esto, esta enzima es responsable del daño renal en nefropatías diabéticas e isquemia-reperfusión de la arteria torácica. La inhibición de la PARP mejora la función cardíaca asociada con un choque séptico, revierte las anormalidades metabólicas y funcionales sobre la neuropatía diabética, entre otros efectos benéficos.

En este trabajo se usaron polvo en ajo, ácido nordihidroguayarático (NDGA) (ambos con propiedades antioxidantes) y *N*-(6-Oxo-5,6-dihidrofenantridina-2-il)-*N*, *N*-dimetilacetamida·HCl) (PJ34), un inhibidor selectivo de la PARP, con el objetivo de analizar si su administración podía prevenir o disminuir los efectos de un modelo de IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$.

En este proyecto se emplearon 107 ratas hembra de la cepa Wistar de 200-230 g de peso de acuerdo a los siguientes esquemas de administración:

Esquema 1:

1. Grupo control: 0.2 mL de SSI s.c.
2. Grupo $K_2Cr_2O_7$: dosis única de $K_2Cr_2O_7$ de 15 mg/kg s.c.
3. Grupo AJO: una alimentación con una dieta suplementada de ajo en polvo al 2% durante 33 días.
4. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +AJO: dieta suplementada de ajo en polvo al 2% durante 30 días. En el día 28 recibieron una dosis única de $K_2Cr_2O_7$ (15 mg/kg s.c.).

Esquema 2:

1. Grupo control: 0.2 mL de SSI s.c.
2. Grupo $K_2Cr_2O_7$: dosis única de $K_2Cr_2O_7$ de 15 mg/kg s.c.
3. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +PJ34: una dosis de PJ34 de 15 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) 1 hora antes, 1, 5, 24, 26, 31 y 46 horas después de la inyección del $K_2Cr_2O_7$ (dosis única de 15 mg/kg s.c.).

Esquema 3:

1. Grupo control: 0.2 mL de SSI s.c.
2. Grupo $K_2Cr_2O_7$: dosis única de $K_2Cr_2O_7$ de 15 mg/kg s.c.
3. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +NDGA: el NDGA (17 mg/kg/día) se administró mediante bombas miniosmóticas 24 h antes de administrar una dosis única de $K_2Cr_2O_7$ (15 mg/kg s.c.). Las bombas miniosmóticas se mantuvieron colocadas durante 48 horas después de la administración de $K_2Cr_2O_7$.
4. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +dimetil sulfóxido (DMSO): El DMSO (30 mg/kg/día s.c.) se administró mediante bombas miniosmóticas (colocadas de manera subcutánea) 24 horas antes de administrar una dosis única de $K_2Cr_2O_7$ (15 mg/kg s.c.). Las bombas miniosmóticas se mantuvieron colocadas durante 48 horas después de la administración de $K_2Cr_2O_7$. Fue necesario manejar este grupo debido a que el DMSO (que tiene propiedades antioxidantes), fue el vehículo en el que se disolvió el NDGA.

Las ratas se sacrificaron por decapitación a las 48 h después de la administración del $K_2Cr_2O_7$, se obtuvieron muestras de suero y de riñón, así como la orina de 24 h. La función renal en el esquema 1 se evaluó por medio de la medición en suero de: creatinina, nitrógeno de urea (BUN) y actividad de glutatión peroxidasa (GPx), en orina de: proteinuria, excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y actividad de glutatión S-transferasa (GST); en el esquema 2 se evaluó, en suero: creatinina y actividad de GPx, en orina: proteinuria y

excreción urinaria de NAG y en el esquema 3 se determinó, en suero: creatinina, BUN y la actividad de GPx y en orina la excreción urinaria de NAG. En los riñones se cuantificó el porcentaje de daño tubular. Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron la oxidación de lípidos mediante la determinación de lipoperoxidación, la oxidación de proteínas mediante la determinación del contenido de grupos carbonilos y se realizó un análisis cuantitativo mediante inmunohistoquímica de 3-nitrotirosina (nitración de proteínas) y de 4-hidroxinonenal (lipoperoxidación). Además en el esquema 3 se analizó cuantitativamente la expresión de la PARP en riñón como marcador de estrés oxidativo.

En los 3 esquemas se observó IRA y estrés oxidativo en los animales que recibieron $K_2Cr_2O_7$, mientras que aquellos que recibieron los diferentes tratamientos (dieta suplementada de ajo, NDGA y el PJ34) mostraron una prevención parcial del daño renal y prevención del estrés oxidativo. Ambos efectos puede ser consecuencia de las propiedades antioxidantes que se le han atribuido al ajo en polvo y al NDGA. Por otro lado el efecto del PJ34 se debe a su capacidad para inhibir a la PARP.

El efecto protector parcial observado en los 3 modelos estudiados puede deberse a que existen otros mecanismos de nefrotoxicidad asociados a la administración de $K_2Cr_2O_7$ como el aumento de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina II, la obstrucción de los túbulos por fragmentos de epitelios dañados y el papel de la hormona tiroides, entre otros, además del daño inducido por estrés oxidativo y la sobreactivación de la PARP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$)

El cromo (Cr) es un metal de transición con número atómico 24, peso atómico 52 y color blanco plateado, duro y quebradizo; se ha encontrado en rocas, plantas, animales y polvo volcánico, además se encuentra formando parte de compuestos como el $K_2Cr_2O_7$ (Barceloux, 1999; Arreola-Mendoza et al., 2006).

El $K_2Cr_2O_7$ es un compuesto sintético cristalino de color anaranjado-rojizo, es un oxidante fuerte y debe manejarse con mucho cuidado (Barceloux, 1999). Es soluble en agua, insoluble en alcohol, tiene un peso molecular de 294.18 y un punto de fusión de 398°C.

1.2. USO INDUSTRIAL

Los compuestos del Cr son utilizados principalmente en tres tipos de industrias: química, metalúrgica y refractaria. Específicamente, el $K_2Cr_2O_7$ es utilizado para la inhibición de la corrosión, el cromado, preparación de limpiadores de cristales, preservación de maderas, fabricación de cerillos, terminados de metales y producción de pigmentos, producción de productos pirotécnicos, explosivos, colorantes, productos para impresión, industria cerámica, se utiliza en la fabricación de acero inoxidable, de hierro colado y de aleaciones ferrosas. Su propiedad como oxidante fuerte se ha aprovechado para limpiar material de vidrio de laboratorio de cualquier resto orgánico que pueda contener y en análisis volumétricos como agente valorante además es ideal en la fabricación de material refractario por su alto punto de fusión (Barceloux, 1999; Stohs et al., 2000).

1.3. TOXICIDAD

El $K_2Cr_2O_7$ se utiliza en múltiples y diferentes procesos productivos, por lo tanto un gran número de trabajadores se encuentran expuestos ocupacionalmente a este compuesto en sus jornadas laborales. Estas actividades se consideran como de alto riesgo para la salud del trabajador y, por tanto, están sometidas a un control especial (Jairo et al., 2004).

La toxicidad del $K_2Cr_2O_7$ ha llevado a la realización de un gran número de estudios que han permitido determinar que su vida media en plasma es de 39 horas (De Flora et al., 1989). El $K_2Cr_2O_7$ debido a su alta solubilidad se absorbe fácilmente por ingestión, por inhalación y por contacto dérmico, siendo estas dos últimas las principales vías en la exposición ocupacional. El $K_2Cr_2O_7$ es mucho más tóxico por inhalación que por ingestión. Una vez en el organismo, el $K_2Cr_2O_7$ entra a las células por acción de un sistema de transporte aniónico para fosfatos y

sulfatos (Blasiak y Kowalik, 2000). Cuando el $K_2Cr_2O_7$ atraviesa la membrana celular de los glóbulos rojos, se une a la fracción globina de la hemoglobina, localizándose luego en el hígado, el bazo, el riñón, los tejidos blandos y el hueso afectando su función y produciendo lesiones reversibles (Jairo et al., 2004).

El $K_2Cr_2O_7$ posee dos características que explican su alto grado de toxicidad: en primer lugar las membranas celulares son permeables al Cr^{6+} y en segundo lugar el Cr^{6+} se reduce a Cr^{3+} en el interior de las células en las mitocondrias y el núcleo, por acción enzimática, por el citocromo p450 o por moléculas reductoras como el glutatión y el ácido ascórbico (Fatima et al., 2005). La reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} intracelularmente y la capacidad de formar complejos de coordinación con otras moléculas intracelulares son dos mecanismos muy importantes en la toxicidad del $K_2Cr_2O_7$ produciendo efectos nocivos reversibles e irreversibles tanto agudos como crónicos en diferentes sistemas del organismo humano (Jairo et al., 2004).

Algunos de los efectos agudos sobre la salud que pueden ocurrir inmediatamente o poco tiempo después de la exposición al $K_2Cr_2O_7$, es decir a corto plazo son (Jairo et al., 2004):

- El contacto con los ojos puede producir graves irritaciones y quemaduras con la posibilidad de daño.
- El contacto dérmico puede irritar y quemar la piel, causar salpullido, ampollas y úlceras cutáneas.
- Respirar $K_2Cr_2O_7$ puede irritar la nariz, la garganta y los pulmones, causar tos, respiración con silbido y/o falta de aire.
- Por ingestión el $K_2Cr_2O_7$ puede producir decoloración dental, náusea, vómito, diarrea y choque cardiovascular debido a la pérdida de sangre por el tracto gastrointestinal. Se han presentado casos de intoxicación por ingestión de agua contaminada con 25 ppm de $K_2Cr_2O_7$ (Wiernikowski, 1991).

Por otra parte se considera al $K_2Cr_2O_7$ como un agente carcinogénico humano (Pritchard et al., 2000; Liu et al., 1999a; Blasiak y Kowalik 2000). El riesgo de cáncer se presenta después de la exposición al $K_2Cr_2O_7$ por meses o años, como el cáncer de pulmón y garganta, que se presenta después de 15 a 20 años de exposición ocupacional. Otros efectos a largo plazo que induce el $K_2Cr_2O_7$ son (Jairo et al., 2004):

- Alergias en la piel y dermatitis.

- La inhalación directa del $K_2Cr_2O_7$ produce lesiones y/o perforaciones en el hueso que divide la nariz interna (tabique nasal), acompañada a veces de secreciones, hemorragias y/o formación de costras. Una exposición repetida a este compuesto puede causar bronquitis con tos, flemas y/o falta de aire.
- La ingestión de dosis muy altas 1.5-10 g de $K_2Cr_2O_7$ diario en humanos produce gastroenteritis aguda, edema cerebral y de pulmones, daño al hígado y riñones y muerte (Wiernikowski, 1991).
- Se ha descrito la aparición de insuficiencia renal aguda y de necrosis tubular renal (Pedraza-Chaverrí, et al., 2005; Barrera et al., 2003a y b).

1.4. GENERALIDADES DEL RIÑÓN

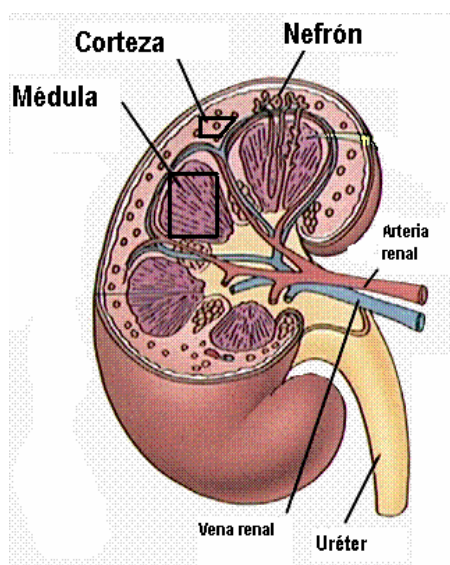


Figura 1. Diagrama de un riñón seccionado longitudinalmente, se muestra la corteza y la médula.

Los riñones son dos estructuras ovales pares ubicadas en la región inferior del abdomen y por debajo del hígado. Se encuentran a ambos lados de la columna vertebral, paralelos a la última vértebra torácica y las tres primeras vértebras lumbares.

Cada riñón en un ser humano adulto mide entre 11 y 12 cm de longitud, 5 a 7.5 cm de ancho y 2.5 a 3.0 cm de espesor. El peso de cada riñón se correlaciona con la superficie corporal y disminuye con la edad sin embargo oscila entre 125 y 170 g en el hombre, mientras que en la mujer su peso es de 115 a 155 g.

El riñón está recubierto de una membrana blanca y delgada que se denomina cápsula fibrosa. Por debajo de la cápsula fibrosa se encuentra la corteza, mayoritariamente la zona externa, en donde se inicia la producción de orina. La corteza (Figura 1) es de color oscuro y de aspecto granuloso, debido a la presencia de los glomérulos y de los túbulos contorneados, contiene pequeños vasos sanguíneos renales y parte de las nefronas. Debajo de la corteza está la médula (Figura 1). La médula es una estructura firme y resistente, de color pálido con zonas de aspecto estriado llamadas pirámides de Malpighi, su aspecto se debe a la porción ascendente de la asa de Henle y de los túbulos colectores; contiene más vasculatura renal y parte de las nefronas, además en ésta área se lleva a cabo la función de concentración de orina y conservación de agua. (Anderson y Cockayne, 1995).

Otras funciones que desempeña el riñón son: a) excreción de productos de desecho del metabolismo como son: urea, creatinina, ácido úrico y amoniaco, b) regulación para la excreción o reabsorción del exceso de agua y electrólitos y con ello conservar el equilibrio ácido-base (Holum, 2001; Guyton, 1997) y c) síntesis de diferentes sustancias con actividad hormonal: eicosanoides, eritropoyetina, renina, angiotensina y vitamina D (Anderson y Cockayne, 1995).

1.4.1. UNIDAD FUNCIONAL

La nefrona es la unidad funcional del riñón, su función es la formación de la orina. Hay alrededor de 2 millones por cada riñón, cada nefrona actúa de manera independiente y está constituida por el glomérulo, la cápsula de Bowman y una porción tubular (Figura 2). La interacción de la nefrona con la vasculatura permite que los riñones efectúen las cuatro funciones fundamentales para preservar la homeostasis del organismo: filtración, reabsorción, secreción y excreción, además de acuerdo a la localización de las nefronas y de la longitud de los túbulos hay nefronas yuxtamedulares, más profundas y nefronas corticales, cortas (Anderson y Cockayne, 1995). La formación de orina inicia en el glomérulo. En el glomérulo se lleva a cabo la filtración de pequeñas moléculas, agua o iones del plasma sanguíneo. El glomérulo se localiza en la corteza renal, está constituido por una red de hasta 50 capilares paralelos cubiertos de células epiteliales, éstas células se encuentran dentro de una envoltura externa en forma de copa llamada cápsula de Bowman. La cápsula de Bowman actúa como recipiente del filtrado del plasma y da origen a una porción tubular (Anderson y Cockayne, 1995). En la porción tubular se lleva a cabo la reabsorción, que permite al organismo recuperar la mayor parte de los líquidos a través de procesos de difusión, ósmosis y transporte activo, la secreción, que permite el paso directo de la circulación a los túbulos y la excreción que consisten en la evacuación total de una sustancia del riñón. La porción tubular que se encuentra en la médula renal está constituida por una primera porción denominada túbulo contorneado proximal que se encuentra recubierto de células que son sumamente permeables al paso de agua, sodio, glucosa, bicarbonato y aminoácidos. En el túbulo contorneado proximal el 75% de las sustancias que han sido filtradas se reabsorben pasivamente. El siguiente segmento de la nefrona es el asa de Henle que está constituida por un miembro descendente, una horquilla y el miembro ascendente. En el asa de Henle se reabsorbe un 25% del sodio y un 15% del agua filtrada. Ambos miembros del asa de Henle son paralelos entre sí, ambos están rodeados de vasculatura renal y son permeables de forma selectiva al desplazamiento de sodio, urea, potasio y agua. La siguiente porción de la nefrona es el túbulo contorneado distal, que se ubica en la corteza renal aquí se secreta potasio e hidrogeniones que contribuyen a la acidificación de la orina,

se reabsorben fracciones variables del 10% de sodio y 15% de agua restantes del filtrado glomerular; y desemboca en el conducto colector y en la pelvis renal.

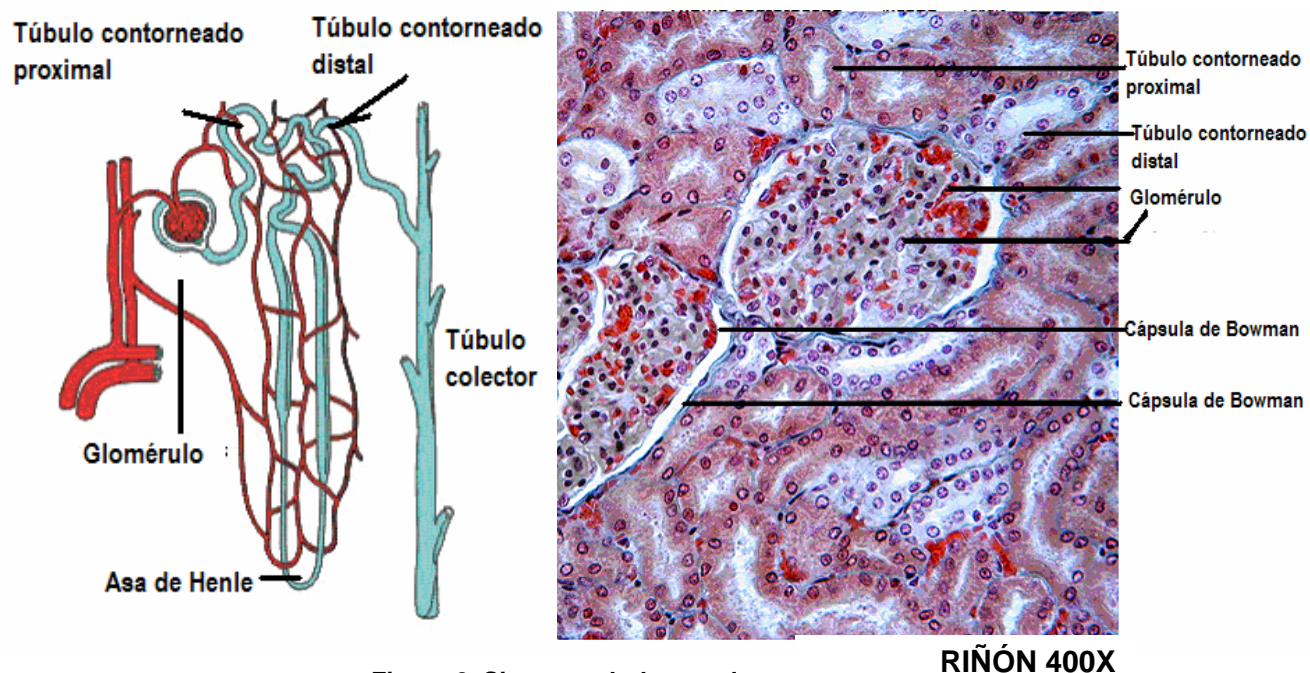


Figura 2. Sistema tubular renal.

Como resultado de los tres procesos renales: filtración, reabsorción y secreción la orina se concentra. Finalmente la orina es conducida a la pelvis renal, pasando a continuación por los uréteres y a la vejiga urinaria (Anderson y Cockayne, 1995).

1.4.2. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

La IRA es un síndrome reversible caracterizado por una rápida disminución de la filtración glomerular lo que ocasiona la acumulación de productos finales del metabolismo y la alteración de la homeostasis de agua y electrolitos (Guyton, 1997).

Las causas de la IRA pueden clasificarse en la siguiente forma (Anderson y Cockayne, 1995; Devalaraja-Narashimha et al., 1994):

1. Causas pre-renales: se considera causa pre-renal a la disminución del flujo sanguíneo por lo tanto se desencadenan efectos sobre la filtración glomerular, pero las estructuras renales se conservan íntegras. Puede ser originado por un choque hipovolémico, transfusional, anafiláctico, séptico o traumático.
2. Causas renales: una causa renal es la inflamación aguda que produce una lesión orgánica de las estructuras renales. Es causada por agentes nefrotóxicos, depósitos intratubulares de pigmentos, glomerulonefritis y nefropatía lúpica, entre otros.

3. Causas post-renales: se debe a una obstrucción de uréter, vejiga, neoplasmas o procesos malignos e hipertrofia prostática entre otros además se afecta el flujo urinario.

La IRA es inducida por la administración de altas dosis de compuestos como el cisplatino, la gentamicina y el cloruro mercúrico (Tabla 1). El porcentaje de daño renal inducido por el $K_2Cr_2O_7$ es del 71%, es mayor con respecto al daño renal inducido por cloruro de mercurio que es de 52% y del cisplatino que es de 25% (Natochin et al., 2006).

Tabla 1. Compuestos que inducen IRA.		
COMPUESTO	USOS	REFERENCIA
Cisplatino	Es un agente antineoplásico el cual actúa al inhibir la síntesis de ADN.	Santos et al., 2007; Iseri et al., 2007
Gentamicina	Es un antibiótico que se emplea para erradicar infecciones bacterianas (Gram negativas).	Kuhad et al., 2006; Maldonado et al., 2005
Cloruro de mercurio	Es un compuesto tóxico que se encuentra en las baterías de celda seca que se utilizan en los aparatos domésticos también se encuentra en algunos antisépticos locales como fungicidas.	Yanagisawa, 1998; Stacchiotti et al., 2006
Ciclosporina	Es un péptido no ribosomal cíclico de 41 aminoácidos. Se utiliza como inmunosupresor durante el trasplante de órganos para reducir el riesgo de rechazo del órgano.	Khan et al., 2006; Sharma et al., 2007
Dicromato de potasio	Empleado en la industria química, metalúrgica y refractaria.	Fatima et al., 2005; Pedraza-Chaverri et al., 2005

1.4.3. IRA INDUCIDA POR $K_2Cr_2O_7$

Debido a su toxicidad, el $K_2Cr_2O_7$ se ha utilizado para reproducir modelos experimentales de IRA en ratas. Una dosis única de 20 mg/kg de peso vía subcutánea (s.c.) de $K_2Cr_2O_7$ alcanza una concentración máxima en suero a las 6 horas después de su administración y después

declina a la mitad del valor máximo a las 48 horas, es a este tiempo en donde se observa el mayor daño estructural (Sugiyama, 1992).

El daño estructural inducido por $K_2Cr_2O_7$ se caracteriza por el daño a las células del túbulo proximal y necrosis, alteración de la membrana borde en cepillo y de las crestas mitocondriales y aumento en el número de vacuolas y lisosomas (Ruegg et al., 1995, Dartsch et al., 1998; Pedraza-Chaverrí, et al., 2005; Arreola-Mendoza et al., 2006).

La administración de $K_2Cr_2O_7$ no afecta el consumo de agua y alimento, por lo tanto tampoco el peso corporal de los animales (Arreola-Mendoza et al., 2006).

El daño renal funcional inducido por $K_2Cr_2O_7$ se caracteriza por disminución del pH urinario, 24 h después de la inyección de $K_2Cr_2O_7$ hay poliuria y se alcanzan valores basales del volumen urinario en el día 7, aumento en la excreción urinaria de proteínas totales, glucosa y sodio, aumento en la actividad urinaria de NAG y aumento de los niveles de creatinina y urea en sangre (Kim y Na, 1991; Appel et al., 1991; Barrera et al., 2003a y b; Arreola-Mendoza et al., 2006; De Tata et al., 1998).

1.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Un radical libre (RL) se define como cualquier especie química ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 2006) ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula (Symons, 1991). La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva. Por lo tanto a concentraciones elevadas estas especies son tóxicas para la célula y los tejidos (Bast et al., 1982).

En la naturaleza, el oxígeno como tal aparece mayoritariamente en forma molecular o diatómica (O_2). El oxígeno es un gas muy importante para los organismos aerobios porque es el último aceptor de los electrones en la cadena respiratoria y lo utilizan muchas enzimas como hemo oxigenasa, NADPH oxidasa y citocromo P450, entre muchas más. A altas concentraciones el oxígeno puede llegar a ser tóxico, debido la producción de especies reactivas. Dentro de estas especies reactivas las que son de mayor interés para la biología o la clínica son las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno en los sistemas biológicos y son sintetizadas y

degradadas por todos los organismos aerobios (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Los RL's pueden ser de origen endógeno o exógeno como se muestra en la Tabla 2 (Freeman y Crapo, 1996; Frei, 1994).

Tabla 2. Fuentes principales de formación de RL's	
EXÓGENOS	ENDÓGENOS
Fármacos como el cisplatino, la ciclosporina y la gentamicina (Deno et al., 1982; Santos et al., 2007; Maldonado et al., 2005)	<p>La cadena de transporte electrónico mitocondrial donde ocurre la transferencia de electrones conocida como reducción univalente del oxígeno (Figura 3).</p> <p style="text-align: center;">Figura 3. Reducción univalente del oxígeno.</p>
Las radiaciones electromagnéticas (Bickers y Athar, 2006).	<p>La xantina oxidorreductasa (XOR) que puede existir en 2 formas funcionalmente distintas: xantina deshidrogenasa dependiente de adenina dinucleótido de nicotinamida oxidado (NAD⁺) y que produce adenina dinucleótido nicotinamida reducido (NADH) y urato; ésta puede transformarse en xantina oxidasa, dependiente de oxígeno y que origina O₂^{•-} y H₂O₂ (Loftus et al., 2007).</p>
Contaminantes aéreos, pesticidas, humo del tabaco, solventes, hidrocarburos aromáticos (Mancuso et al., 2007).	<p>Los fagocitos activados poseen diversas enzimas como NADPH oxidasa, mieloperoxidasa y óxido nítrico sintasa que generan ERO que matan a los microorganismos extraños que ingresan al organismo (Babior, 1978).</p>

1.5.1. ANIÓN SUPERÓXIDO (O₂^{•-})

Las fuentes principales de formación de O₂^{•-} son la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa y la reducción univalente del oxígeno molecular (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997). El O₂^{•-} puede iniciar y propagar la oxidación de catecolaminas, tetrahydropterinas y otros compuestos relacionados, no es capaz de atacar de manera significativa a lípidos poliinsaturados o al

ADN, sin embargo es muy importante en varias patologías porque se genera en gran cantidad y sufre una conversión significativa hacia otras ERO que son muy reactivas y dañinas, tales como el H₂O₂. Por otro lado, puede captar un electrón y dar lugar al radical perhidroxilo o hidroperóxido (HO₂[•]), mucho más reactivo que el O₂^{•-} (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006; Halliwell, 1996b).

1.5.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

El H₂O₂ no es un RL. Su importancia radica en que el H₂O₂ participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de RL's y que posee una gran lipofilicidad que le permite atravesar con suma facilidad las membranas biológicas y difundirse a los organelos, dando lugar a reacciones de oxidación y generar OH[•] (Cheeseman y Slater, 1993; Frei, 1994). Las fuentes principales de formación de H₂O₂ son la reducción univalente del oxígeno molecular y la dismutación del O₂^{•-} (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997).

1.5.3. RADICAL HIDROXILO (OH[•])

El OH[•] es la especie con una vida media corta y la más reactiva. Se genera por la lisis del H₂O o del H₂O₂ por acción de las radiaciones ionizantes, por la reducción del H₂O₂ por iones de metales de transición (Figura 4) ésta reacción se conoce como reacción (1) de Fenton. Los iones metálicos se regeneran gracias al O₂^{•-} (reacción 2). La suma de la reacción 1 y 2 se le conoce como reacción (3) de Haber-Weiss (Cheeseman y Slater, 1993; Breen y Murphy, 1995; Wardman y Candejas, 1996; Frei, 1994; Sawyer, 1988).

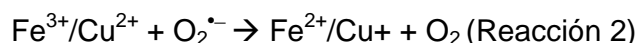
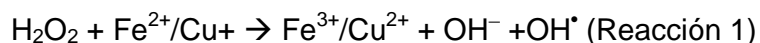


Figura 4. Formación de OH[•] por la reducción del H₂O₂ por iones de metales de transición.

1.5.4. OXÍGENO SINGULETE (¹O₂)

El ¹O₂ es una forma excitada del O₂. Existen dos formas del ¹O₂: la sigma (Σ) que es un radical libre muy inestable y la delta (Δ) que no es un radical libre pero tiene importancia en los sistemas biológicos al ser muy reactivo sobre todo con los lípidos de membrana lo que produce radical peroxilo. La formación de ¹O₂ es llevada a cabo por fagocitos activados (Eberhardt, 2001), por acción de la luz sobre el O₂ en reacciones de oxidación de diversas especies o en el transcurso de algunas reacciones enzimáticas, además puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas (Zhou et al., 2006).

1.6. ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (ERN)

1.6.1. ÓXIDO NÍTRICO (NO•)

El NO• es un gas lipofílico e hidrosoluble, se forma durante la conversión de L-arginina a L-citrulina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa que tienen tres isoformas: la neuronal (nNOS o tipo I), la endotelial (eNOS o tipo III) y la inducible (iNOS o tipo II). El NO• regula el flujo sanguíneo, inhibe la agregación plaquetaria, contribuye a la defensa inmunitaria, actúa como neurotransmisor y posee acción antiinflamatoria. El NO• a concentraciones elevadas genera metabolitos que pueden reaccionar con el O₂, H₂O₂, O₂^{•-} inactivando enzimas y reaccionando con ácidos nucleicos que dan lugar a mutaciones y roturas del ADN (Bredt et al., 1991; Lamas et al., 1992; Moncada et al., 1991; Bush et al., 1992; Czapski y Goldstein, 1995).

1.6.2. PEROXINITRITO (ONOO⁻)

El NO• reacciona con el O₂^{•-} para dar lugar al ONOO⁻, un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad (Figura 5). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas e interferir con la señalización celular por nitración de residuos de tirosina en proteínas y es capaz de fragmentar ADN (Chirino et al., 2004, 2006).

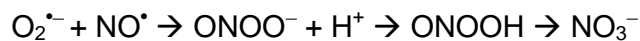


Figura 5. Formación de metabolitos a partir del NO•

1.6.3. DIÓXIDO DE NITRÓGENO (NO₂•)

El NO₂• es un RL contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO• atmosférico (Postlethwait, 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Halliwell, 1994).

1.7. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras (Sies y Mehlhorn, 1986). Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

1.7.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO A BIOMOLÉCULAS

El daño celular producido por las ERO ocurre sobre diferentes biomoléculas (Tabla 3):

MOLÉCULA	DAÑO OXIDATIVO
LIPIDOS	El proceso se denomina peroxidación lipídica. El daño tiene lugar sobre los ácidos grasos poliinsaturados lo que provoca su peroxidación que deriva en la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, ruptura de los gradientes iónicos transmembranales y la muerte celular (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006; Gutteridge y Halliwell, 1990).
PROTEÍNAS	El daño se ejerce sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol. Así el triptofano, la tirosina, la fenilalanina, la histidina, la metionina y la cisteína pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales como la inactivación enzimática, rompimiento de enlaces peptídicos, entrecruzamientos de cadenas peptídicas y hay formación de grupos carbonilos (Katz et al., 1996, Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006; Stadtman, 1990).
ADN (Ácido desoxirribonucleico)	El daño oxidativo se produce por modificaciones en las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. Alterando la duplicación y la transcripción originando fenómenos de mutación y cáncer (Muniyappa y Kironmai, 1998, Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverrí, 2006).

1.7.2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD

Las ERO han sido implicados como importantes mediadores patológicos en un gran número de trastornos clínicos (Tabla 4).

Enfermedad	ERO Involucradas	Referencia
Cáncer (próstata, pulmón, hígado, leucemia).	H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$	Manfred y Eberhardt, 2001; Agostinelli et al., 2006; Kiningham, 1998; Wiseman y Halliwell, 1996a; Buschfort et al., 1997.
Isquemia-Reperfusión	H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$	Manfred y Eberhardt, 2001; Mao et al.,

(corazón, cerebro, pulmón, riñón).		1993; Aguilar et al., 2007; Kamada et al., 2007 ; Zheng et al., 2005.
Aterosclerosis	H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}	Manfred y Eberhardt, 2001; Ryszawa et al., 2006; Surdacki et al., 2007 ; Torzewski et al., 2007.
Diabetes	H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$	Goth, 2006; Thum et al., 2007 ; Chirino et al., 2006.
Hepatitis	H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}	Chiou et al., 2006; Wang y Weinman 2006; Uchiyama et al., 2006; Groenbaek et al., 2006.
Neumonía	NO^{\bullet} , $ONOO^-$, NO_2^- , H_2O_2	Cemek et al., 2006 ; Tan et al., 2006. Khan et al., 2005 ; Ader et al., 2007 ; Ren et al., 2006.
Artritis reumatoide	H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , $ONOO^-$	Surdacki et al., 2007; Chirino et al., 2006.
Enfermedad de Huntington	OH^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$, NO^{\bullet}	Firdaus et al., 2006 ; Orozco-Ibarra et al., 2006 ; Browne y Beal, 2006; Goswami et al., 2006.
Enfermedad de Parkinson	OH^{\bullet} , H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$, NO^{\bullet}	Manfred y Eberhardt, 2001; Dickson, 2007; Mancuso et al., 2006; Orozco-Ibarra et al., 2006; Shukla et al., 2006.
Enfermedad de Alzheimer	OH^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$, NO^{\bullet}	Manfred y Eberhardt, 2001; Siegel et al., 2007; Mancuso et al., 2006; Newman et al., 2007.

1.7.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR $K_2Cr_2O_7$

Hay evidencia de que en el mecanismo de la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ esta implicado el estrés oxidativo y nitrosativo (Pedraza-Chaverrí et al., 2005).

Anteriormente se menciona que una vez que el $K_2Cr_2O_7$ penetra en las células, son reducidos por enzimas como la citocromo P450 y por moléculas reductoras como el glutatión y el ácido ascórbico, generándose otro iones reactivos de Cr como ERO (Dartsch et al., 1998) por lo tanto provocar daño oxidativo en hepatocitos (Bagchi et al., 1997), en cerebro (Travacio et al., 2001) y en riñón (Bosgelmez y Guvendik, 2004; Arreola-Mendoza et al., 2006).

El mecanismo por el cual se incrementa la producción de ERO aun se desconoce pero en estudios *in vitro* utilizando espectroscopia de resonancia paramagnética se ha sugerido que:

- En presencia de GPx y de NADPH, el Cr^{6+} se reduce a Cr^{5+} generando OH^{\bullet} (Shi y Dalal, 1989; Xie y Zhuang, 2001).
- Otros estudios indican que el Cr^{6+} puede interaccionar con grupos tioles como por ejemplo el del GSH produciendo Cr^{5+} , el cual es capaz de reducir al oxígeno molecular generando $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figura 6). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ a su vez es reducido por la acción de la SOD y el H_2O_2 que se produce al interaccionar con el Cr^{5+} mediante una reacción tipo Fenton se produce la ruptura de la molécula de H_2O_2 generándose el OH^{\bullet} (Figura 6) (Jones et al., 1991; Liu y Shi, 2001; Hojo y Satomi, 1991; Pourahmad y O'Brien, 2001; Sugiyama, 1992).

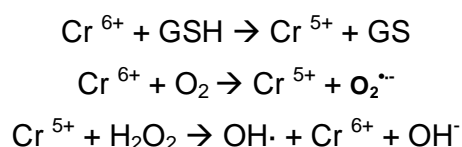


Figura 6. Mecanismo propuesto para la formación de radicales OH^{\bullet} y $\text{O}_2^{\bullet-}$ dependientes de Cr^{6+} o Cr^{5+} .

Algunos estudios *in vitro* sugieren que la reacción anterior puede generar, además de OH^{\bullet} , el $^1\text{O}_2$ con la participación de algunas moléculas de agua (Kawanishi et al., 1986).

Además se demostró el aumento de estrés oxidativo en el daño renal inducido por el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Sengupta et al., 1992; Liu y Shi, 2001; Bagchi et al., 1997) mediante la evaluación de los siguientes parámetros:

- Lipoperoxidación: El $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ incrementa la lipoperoxidación a las 24 horas después de haber administrado el tóxico y alcanza un máximo a las 48 horas observándose valores basales a las 72 horas (Arreola-Mendoza et al., 2006; Huang et al., 1999).
- Actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos en riñón: Después de 48 horas de la administración de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ no se encuentran cambios en la actividad enzimática de Cu, Zn-SOD, Mn-SOD y GPx. Sin embargo se observa un aumento de la actividad de la hemo oxigenasa-1 y una disminución de 25% y 40% en la actividad de GR y catalasa, respectivamente (Barrera et al., 2003a y b).
- Contenido de grupos carbonilo: Se reporta un aumento del 33.3% y 25% del contenido de grupo carbonilo en proteínas en el grupo tratado con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ respecto al grupo

control después de 24 horas y 48 horas de la inyección con $K_2Cr_2O_7$ (Barrera et al., 2003b).

- 3-nitrotirosina: Se encontró un aumento al de 3-nitrotirosina a partir de las 24 horas después de la administración de $K_2Cr_2O_7$ y se alcanzaron valores basales a partir del día 8 (Pedraza-Chaverrí et al., 2005).
- Excreción urinaria de nitratos y nitritos: Hay una disminución en la excreción urinaria de nitratos y nitritos 48 horas después de haber administrado el $K_2Cr_2O_7$ y se observaron valores basales a partir del día 6 (Pedraza-Chaverrí et al., 2005).

Cabe mencionar que la excreción urinaria de nitratos y nitritos se relaciona con la producción de NO^* . La disminución de este parámetro se relaciona con una disminución en la producción de NO^* en las ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ lo que sugiere que el NO^* pudiera estar reaccionando con el $O_2^{\cdot-}$ para generar $ONOO^-$ y otras ERN que intervienen en la nitración de proteínas. Por tanto ambos procesos se relacionan: el aumento en la 3-nitrotirosina y la disminución en la excreción urinaria de nitratos y nitritos (Pedraza-Chaverrí et al., 2005).

1.8. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

El organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática, diseñados para protegerse de la acción de las ERO.

Un antioxidante es cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato (Halliwell, 1995).

Pueden actuar previniendo la formación de ERO, interceptando el ataque de las ERO, secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas, amplificando la resistencia de las macromoléculas sensibles al ataque de las ERO, facilitando la reparación del daño causado por las ERO y manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Desde un punto de vista bioquímico, se clasifican en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

1.8.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Existen varias enzimas destinadas a convertir las ERO menos reactivas en moléculas inocuas, antes de que promuevan la generación de moléculas más reactivas, capaces de

reaccionar y dañar las estructuras celulares. Algunos de estos sistemas se muestran en la Tabla 5 (Wells et al., 2005; Mates et al., 1999; Rahman et al., 2006; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Tabla 5. Sistemas antioxidantes enzimáticos		
ENZIMA	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN
Superóxido dismutasa (SOD)	Es una metaloenzima que cataliza la reacción que transforma el $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 . Puede contener manganeso o cobre y zinc.	Matriz mitocondrial y citoplasma celular.
Catalasa	La catalasa participa en la reducción de H_2O_2 a través de una reacción que da lugar a agua y a una molécula de oxígeno.	Peroxisomas, mitocondrias y citosol.
Glutación peroxidasa (GPx)	Es una selenoenzima presente en varias isoformas: citosólica, plasmática y de fosfolípidos. Cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de glutación reducido (GSH) y formando glutación oxidado (GSSG) y el agua.	Matriz mitocondrial, citosol, membrana plasmática.
Glutación reductasa (GR)	Cataliza la reducción de GSSG a dos moléculas de GSH empleando NADPH.	Citoplasma.
Glutación-S-transferasa (GST)	Cataliza la conjugación de GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos. Puede reducir hidroperóxidos de lípidos.	Citosol y microsomas.

1.8.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Son algunos compuestos que poseen la capacidad de interactuar directamente con las ERO. Se clasifican en sistemas enzimáticos hidrosolubles y liposolubles. Algunos de estos sistemas se muestran en la Tabla 6 (Waring et al., 2003; Halliwell y Gutteridge 1999; Rahman et al., 2006; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006):

Tabla 6. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.		
SISTEMA ANTIOXIDANTE Y LOCALIZACIÓN	CARACTERÍSTICAS GENERALES	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
Sistemas antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles.		
GLUTATIÓN (GSH)	El GSH es el tiol no proteico más abundante en las	Reacciona con HO^{\bullet} y $O_2^{\bullet -}$, así

INTRACELULAR	células de mamíferos. El GSH está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina.	como radicales libres orgánicos
ÁCIDO ÚRICO	Se produce durante la oxidación de hipoxantina y xantina por la enzima xantina oxidasa está presente en suero.	Previene la formación de productos de lipoperoxidación Atrapa HO•, O ₂ ^{•-} y ROOH, se une a metales de transición.
EXTRACELULAR		
VITAMINA C	Sus características estructurales le permiten reaccionar con ROS oxidándose a dihidroascorbato.	Esta vitamina es efectiva contra el O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , HO•. En solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana.
INTACELULAR Y EXTRACELULAR	Las mayores fuentes de ascorbato en la dieta son las frutas, especialmente los cítricos.	
Sistemas antioxidantes no enzimáticos liposolubles.		
BILIRRUBINA	La bilirrubina 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 <i>in vitro</i> , que actúa sobre radicales peroxilo y ¹ O ₂ . Protege a la albúmina contra el daño por RL.
TEJIDOS Y SANGRE		
VITAMINA E	Bajo esta denominación se incluye una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles.	La vitamina secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo es bloqueador de la cadena de lipoperoxidación en la fase de propagación
MEMBRANAS, FLUIDOS EXTRACELULARES	Las fuentes ricas de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, de soja y de semilla de algodón) y productos hechos a partir de estos aceites como la margarina o la mayonesa.	
B-CAROTENO	Precursor de la vitamina A, se encuentra distribuido ampliamente en tejidos de vegetales como las zanahorias.	impide la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el ¹ O ₂ y el OH•
MEMBRANAS		

1.8.3. ANTIOXIDANTES Y LA IRA INDUCIDA POR K₂Cr₂O₇

Algunos antioxidantes como el ácido el ascórbico, la vitamina E, la N-acetil cisteína, el alfa-tocoferol y el glutatión previenen el daño renal inducido por K₂Cr₂O₇ (Tabla 7) mientras que la inhibición de la biosíntesis de GSH aumenta el daño renal (Appenroth y Winnefeld, 1998; Hojo y Satomi, 1991; Na et al., 1992; Standeven y Wetterhahn, 1991; Sugiyama, 1992; Arreola-Mendoza et al., 2006).

Tabla 7. Disminución del daño renal inducido por Cr⁶⁺ por el uso de antioxidantes.			
MODELO	DOSIS	ANTIOXIDANTE	REFERENCIA.
Ratas hembra Wistar de 200 g.	K ₂ Cr ₂ O ₇ 15 mg/kg vía s.c	Alfa-tocoferol 125 mg/kg vía oral por 7 días.	Arreola-Mendoza et al., 2006

Ratas macho Wistar 150-170 g.	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Dicromato de sodio). 1 mg/100 g de peso vía s.c.	Tenox GT-2 que contiene 9% de alfa-tocoferol y 46% de gamma-tocoferol. Se administró 10 y 100 mg/100 g de peso disuelto en 0.5 mL de aceite de oliva/100 g de peso, se administró por vía intramuscular (i.m.) después de administrado el tóxico a diferentes tiempo.	Appenroth et al., 2001
Ratas macho Wistar (100-120 g).	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 127 mg/kg vía oral.	Vitamina B6 100 mg/kg via oral 12 horas antes de administrar el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.	Anand, 2005
Polluelos de 2 días de nacido.	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10 mg/kg/día i.m.	Glutación 50 mg/kg/día, un complejo de vitamina B 20 mg/kg/día y vitamina E 60 mg/kg/día i.m. por 7 días.	Chundawat y Sood, 2005
Conejos machos.	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 5 mg/kg vía oral.	Acido fólico 8.3 g/kg via oral	Yousef et al., 2006

El ajo en polvo y el ácido nordihidroguayarético atrapan e inhiben la producción de ERO, por esto, son objeto de estudio ya que pueden tener algún efecto benéfico sobre la IRA inducida por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

1.9. AJO



Figura 7. El ajo

El ajo (Figura 7) cuyo nombre científico es *Allium sativum* es una planta que ha sido objeto de múltiples investigaciones, es utilizada como condimento en las comidas, pero también se ha consumido tradicionalmente como un remedio y como una medicina popular desde hace muchos años en todo el mundo, debido a que se le atribuyen diferentes propiedades como antimicrobiano, antimicótico, antineoplásico, cardioprotector, inmunosupresor, hipoglicémico, hipolipémico y antioxidante (Sato y Miyata, 2000; Koch y Lawson, 1996; Rietz et al., 1993; Ismail et al., 1999).

La composición del ajo es muy compleja. Los compuestos más abundantes de los dientes de ajo son: agua, carbohidratos, fibras, proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales, entre muchos más (Lawson 1998). Además es uno de los vegetales que contiene niveles elevados de selenio, lo que contribuye principalmente a sus propiedades antineoplásicas (Koch y Lawson 1996; Lawson 1998). También posee un alto contenido de compuestos azufrados, entre los cuales se encuentra la S-alquil-L-cisteína sulfóxidos y la γ -L-glutamil-S-alquil-L-cisteínas siendo la alina el compuesto de azufre más abundante en el ajo. Esta última se encuentra compartimentalizada dentro de las células, por tanto, cuando el ajo sufre algún proceso mecánico, esto es cuando es cortado y/o triturado, la enzima vacuolar alinasa que se encuentra en las células mesófilas, rápidamente actúa sobre la alina para formar la alicina y ésta última debido a su inestabilidad y a diferentes condiciones de tratamiento da lugar a la formación de otros compuestos organosulfurados, aliisulfuros o polisulfurados que son olorosos, altamente volátiles y con efectos antitrombóticos (Block, 1996). La alicina, es el principal constituyente del olor característico del ajo, que está presente en el ajo fresco picado y en polvo. La alina es inodora y es el compuesto de azufre más abundante del ajo.

1.9.1. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Ya que los antioxidantes son importantes en el tratamiento de padecimientos como el cáncer y la aterosclerosis, numerosos estudios en animales y en humanos han sido conducidos con ajo (Koch y Lawson 1998; Lawson 1998). Dichos estudios han demostrado consistentemente buena actividad la cual se ha hecho evidente por una disminución de la lipoperoxidación, un incremento en el atrapamiento de RL's, la inhibición de la producción de RL's y un incremento en GSH (Lawson 1998; Fólger y Blackwood 1991).

La gran mayoría de las investigaciones analíticas y farmacológicas del ajo están enfocadas a sus compuestos con azufre por esto se han buscado aislarse y sintetizarse para poder estudiar sus propiedades terapéuticas. Varios de estos compuestos poseen actividad antioxidante como se muestra en la Tabla 8 (Block, 1996).

Debido a que el ajo contiene un gran número de compuestos organosulfurados se han estudiado en diferentes preparaciones del ajo, entre las cuales se encuentra: el extracto de ajo envejecido, el ajo deshidratado y el ajo en polvo que están disponibles como tabletas, grageas, cápsulas y extracto hidroalcohólico. En la Tabla 9 se muestra algunos modelos en los cuales las preparaciones del ajo y los compuestos organosulfurados han tenido algún efecto benéfico.

1.9.2. AJO EN POLVO

El ajo en polvo es utilizado como condimento en la preparación de alimentos y también posee propiedades terapéuticas por esto lo encontramos comercialmente en forma de tabletas, grageas y cápsulas (Block, 1996; Lawson, 1998).

Tabla 8. Algunos compuestos organosulfurados con propiedades antioxidantes.		
COMPUESTO CON AZUFRE	ACTIVIDAD	REFERENCIA
Alina	Reduce la producción de OH [*] Atrapa H ₂ O ₂ Inhibe la lipoperoxidación	Kourounakis y Rekka 1991; Chung, 2006.
S-alilcisteína	Reduce la producción de OH [*] Atrapa H ₂ O ₂ , ONOO ⁻ Inhibe la lipoperoxidación Inhibe la producción de O ₂ ^{*-}	Kim et al., 2006; Chung, 2006; Padmanabhan y Prince, 2006.
S-alilmercaptocisteína	Atrapa H ₂ O ₂ Inhibe la lipoperoxidación	Ide et al., 1996; Sumioka et al., 1998; Imai et al., 1994; Pedraza-Chaverrí et al., 2004a.
Dialil disulfuro	Inhibe la lipoperoxidación	Wu et al., 2005; Koh et al., 2005; Fanelli et al., 1998.
Alil sulfuro y propil disulfuro	Inhiben la lipohidroperoxidación	Yang et al., 1993.
Alicina	Reduce la producción de OH [*] Inhibe la lipoperoxidación Atrapa ¹ O ₂ <i>in vitro</i>	Prasad et al., 1995; Xiao y Parkin, 2002.

Tabla 9. Modelos experimentales en donde se observó un efecto benéfico que se le atribuyó a la capacidad antioxidante del ajo y sus compuestos.		
TRATAMIENTO	ESTUDIO	REFERENCIA

Dieta enriquecida con polvo de ajo al 2%.	Daño por isquemia-reperfusión en preparaciones de corazón aislado de ratas alimentadas con ajo crudo por 8 semanas.	Rietz et al., 1993
	Nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas alimentadas con ajo por 2 semanas.	Pedraza-Chaverri et al., 2000a
Extracto de ajo envejecido (AGE)	Nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas, intraperitoneal 1.2 mL /kg 2 días antes y por 4 días después de inducir el daño.	Maldonado et al., 2003a
	Nefrotoxicidad inducida por ciclosporina A, en ratas, se administro AGE vía oral 0.25-2 g/kg/día tres días antes y 7 días después de inducir el daño.	Wongmekiat y Thamprasert, 2005
S-alil cisteína (SAC)	Daño por isquemia-reperfusión en cerebro de ratas 300 mg/kg, vía intraperitoneal, 30 minutos antes de la isquemia	Numagami et al., 1996; Numagami y Ohnishi, 2001.
	Insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina en ratas, 125 mg/kg/12 h, vía intraperitoneal, por 6 días.	Maldonado et al., 2003b
Alicina	Daño por isquemia-reperfusión en pulmón de ratas.	Batirel, 2002
Dialildisulfuro	Insuficiencia renal aguda inducida por gentamicina en ratas, dosis 50 mg/kg/12 h, vía intragástrica, por 4 días.	Pedraza-Chaverri, 2003
S-alilmercaptocisteína (SAMC)	Previene parcialmente el daño renal funcional y estructural inducido por gentamicina.	Pedraza-Chaverri et al., 2004.

La capacidad antioxidante del ajo en polvo se ha estudiado en extractos acuosos y se ha visto que es capaz de atrapar OH^\bullet (Lewin y Popov, 1994), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Torok et al., 1994). Además inhibe la oxidación de las lipoproteínas (Pedraza-Chaverri et al., 2004b), esta capacidad se le atribuye a compuestos como la S-alilcisteína, N-acetil-S-alilcisteína, S-etilcisteína, N-acetilcisteína, alicina, dialil sulfuro, dialil disulfuro y S-alilmercaptocisteína. La alicina es capaz de atrapar OH^\bullet e inhibir la lipoperoxidación y prevenir el daño a pulmones inducida por isquemia-reperfusión (Pedraza-Chaverri et al., 2006).

El ajo en polvo se ha utilizado como suplemento alimenticio en varios modelos en donde se observaron efectos de prevención y de protección como se muestra en la Tabla 10.

Debido a las propiedades antioxidantes del ajo en polvo, su bajo costo y su uso extendido, es atractivo estudiar su efecto terapéutico en el daño renal mediado por las ERO. En este trabajo se planteó el uso del ajo en polvo, porque es una de sus formas de mayor consumo y debido a que se sabe que durante el proceso de deshidratación el ajo en polvo no pierde sus propiedades antioxidantes.

Tabla 10. Efecto del tratamiento con una dieta suplementada con ajo en polvo al 2%.		
DIETA Y TIEMPO DE TRATAMIENTO	EFFECTOS	REFERENCIA
Dieta al 0.5, 2 y 5% por 11 semanas.	Efecto quimiopreventivo en ratas.	Kweon et al., 2003
Dieta al 4% por 14 días	Previene la hepatotoxicidad en ratas	Oboh, 2006
Dieta al 5% por 2 semanas	Inhibe el proceso carcinogénico en hígado y colón de rata.	Singh et al., 2006
Dieta al 1% por 12 semanas.	Inhibe el proceso aterogénico en conejos.	Kwon et al., 2003
Dieta al 2% por 28 días.	Protección en la hipocolesterolemia inducida en conejos.	Ismael et al., 1999
Dieta al 2% por 8 semanas	Reduce el estrés oxidativo en ratas hiperlipidemicas	Kempaiah y Srinivasan, 2004
Dieta al 2% por 84 días.	Disminuye el daño nefrótico inducido por puromicina de aminonucléosido en ratas.	Pedraza-Chaverrí et al., 2000b
Dieta al 2% por 2 semanas.	Disminuye el daño nefrótico en ratas inducido por gentamicina.	Pedraza-Chaverrí et al., 2000a

1.10. ÁCIDO NORDIHIIDROGUAYARÉTICO (NDGA)

Larrea tridentata (Figura 8) es una planta que mide de 0.6 a 3 metros de altura encontrada en el suroeste de América y noreste de México. Esta planta es conocida como chaparral. Las

hojas de esta planta se utiliza en la fabricación de adhesivos, poseen un alto contenido de proteínas que le permite utilizarlo para consumo animal, se utilizan en preparación de infusiones para el tratamiento contra la fiebre, los cólicos, los trastornos digestivos, el dolor, el reumatismo, entre muchas más, además la resina que poseen las hojas se utiliza para teñir cuero, para la elaboración de grasas, aceites, lubricantes, barnices y jabones, de esta resina se han extraído fenoles que se han utilizado en la fabricación de pinturas y plásticos. Pero también el botón de la flor se ha utilizado como condimento (Lambert et al., 2002).



Figura 8. *Larrea tridentata*

Esta planta es una mezcla de más de 300 compuestos, entre los que se encuentran: flavonoides glicosilados, esteroides, sapogeninas, aceites esenciales, monoterpénoides y sesquiterpenoides aromáticos, alcaloides y lignanos (Arteaga et al., 2005). El principal componente que se ha encontrado en la superficie de las hojas de la planta y que representa alrededor del 10-15% del peso seco de la planta y un 80% los compuestos fenólicos presentes en la resina que se extrae de la hojas de la planta es un lignano conocido como el NDGA (Figura 9) (Schultze-Mosgau et al., 1998; Fujimoto et al., 2004; Arteaga et al., 2005).

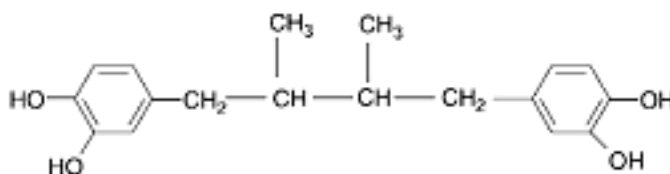


Figura 9. Estructura química del NDGA.

El NDGA fue utilizado como aditivo alimentario, principalmente para la preservación de aceites, mantequillas y en general de grasas ejerciendo efecto como antioxidante. Posteriormente se detectó que el NDGA producía daño y quistes en el riñón en ratas que

recibieron una dieta suplementada con NDGA, Goodman et al., (1970) utilizó una dieta de NDGA al 2% por 15 días en ratas normales y Gardner et al., (1978) utilizó una dieta de NDGA al 2% por 22 días en ratas normales, esto corresponde a una dosis de 1.1 g/kg/día para una rata de 300g. Lambert et al., encontró que la dosis hepatotóxica letal 50 en ratones es de 75 mg/kg intraperitoneal (i.p.). Como consecuencia de estos resultados fue eliminado de las listas de la FDA y se prohibió su uso en alimentos. Sin embargo, se ha continuado investigando exhaustivamente su comportamiento en diferentes modelos ya que se ha encontrado que el NDGA presenta excelentes propiedades antioxidantes, actividad anti-inflamatoria, antimicrobiana, antineoplásica, antifúngico entre otras más. En estudios *in vitro* el NDGA se ha utilizado como inductor de apoptosis en líneas celulares cancerígenas a concentraciones entre 2.5-200 μM tal es el caso de células cancerígenas pancreáticas humanas (Tong et al., 2002), células de carcinosarcoma de rata W256 (Tang et al., 1997), células EMT6 de carcinoma de rata (Shi y Pardini, 1995), además induce estrés oxidativo y lipoperoxidación en hepatocitos clon-9 de rata a concentraciones de 20-100 μM (Sahu et al., 2006). De igual forma *in vitro* se ha demostrado la disminución del daño neurotóxico inducido por N-metil-D-aspartato usando 100 μM de NDGA en neuronas del hipocampo de ratas (Rothman, 1993) y en Fibroblastos V79 inhibe la lipoperoxidación utilizando concentraciones de 1-10 μM (Robinson et al., 1990).

Por lo tanto en dosis bajas el NDGA se ha utilizado en el tratamiento de varios padecimientos como: anemia, artritis, reumatismo, bronquitis, diabetes, tuberculosis, úlceras e indigestión, diarrea, infecciones de las vías urinarias, entre muchas más (Arteaga et al., 2005).

1.10.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

El NDGA posee excelentes propiedades antioxidantes. Es un inhibidor no selectivo de la lipooxigenasa y de la xantina oxidasa por lo tanto previene la formación de ERO (Cheng y Jan 2002; La et al., 2003; Nishimura et al., 2004; Anjaneyulu y Chopra, 2004). Y es capaz de atrapar OH^{\bullet} , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$, ONOO^- *in vitro* y de prevenir la nitración de proteínas *in vivo* (Floriano-Sánchez et al., 2006).

Aprovechando su capacidad antioxidante se ha utilizado en varios modelos (Tabla 11) observando un efecto benéfico ante el tratamiento con NDGA.

Debido a que el NDGA a dosis bajas es responsable en varios modelos del efecto protector y es de origen natural también se convirtió al igual que el ajo en polvo en objeto de estudio del efecto sobre la IRA inducida por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Tabla 11. Efectos benéficos del tratamiento con NDGA.		
EFEECTO	TRATAMIENTO	REFERENCIA
Atenúa el daño post-isquémico neuronal.	Administración por 4 días de NDGA 10 mg/kg i.p. disuelto en DMSO 30 minutos antes de la isquemia y 3 días después de la isquemia.	Shishido et al., 2001
Protección en el daño pulmonar inducido por exposición diaria de 0.05 ppm de ozono por 7 días.	Se administró el NDGA a 20 mg/kg s.c. usando bombas miniosmóticas	Floriano-Sánchez et al., 2006
Protección contra el daño renal inducido por Fe-NTA.	1-2 mg de NDGA al día en 0.2 mL de aceite de maíz vía oral por una semana.	Ansar et al., 1999
Previene la nefropatía diabética.	5-10 mg/kg s.c. por 4 semanas.	Anjaneyulu y Chopra, 2004
Reduce la formación de metabolitos que se producen en procesos de isquemia-reperusión en cerebro.	0.1 mg/kg s.c. antes de la isquemia.	Aktan et al., 1993

El tercer compuesto que se estudió es el PJ34 un inhibidor selectivo de la PARP.

1.11. POLI-ADP-RIBOSA POLIMERASA (PARP)

La poli (adenosina-5'-difosfato-[ADP]-ribosa) sintetasa también conocida como PARP es una enzima nuclear de 113 kDa abundante en las células eucarióticas que está involucrada en diversos procesos tales como reparación y replicación del ADN, transcripción génica, muerte celular y respuesta inflamatoria (Shall y De Murcia, 2000; Jagtap et al., 2002; Dantzer et al., 2006). La PARP se activa en respuesta a daños en el ADN generados por diferentes agentes genotóxicos tales como radiación ionizante, agentes alquilantes y/o radicales libres. Se ha observado actividad de la PARP durante los procesos de reparación por escisión de bases y reparación de daños de cadena simple (Tulin y Sprading, 2003; Gordon-Shaag et al., 2003; Bürkle, 2005; Schreiber et al., 2006; Abdelkarim et al., 2001).

Esta enzima posee tres dominios principales: a) un dominio de unión al ADN situado en el extremo amino a través del cual se produce la interacción de PARP con el ADN, lo cual estimula la actividad catalítica de la enzima, b) un dominio de automodificación que comprende la mayoría de sus residuos de ácido glutámico que son modificados por poli-

ADP-ribosilación y en el carbono terminal y c) un dominio catalítico de unión a la adenina dinucleótido de nicotinamida (NAD⁺) (Burkle, 2005; Burkle, 2006; Schreiber et al., 2006).

La PARP cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa procedentes del sustrato NAD⁺ sobre los residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de una serie de proteínas nucleares como histonas, factores de transcripción y enzimas que reparan el daño al ADN incluyendo a la PARP formando un polímero de poli-ADP-ribosa que alcanza una extensión de aproximadamente 200 elementos unidos por enlaces glicosídicos de ribosa-ribosa y con ramificaciones por cada 20-50 unidades de ADP-ribosa (Álvarez-González et al., 1999, Kraus y Lis 2003; Virág y Szabó, 2002). Esta modificación constituye un tipo de modificación postraduccional covalente que permite a estas proteínas modificar su función biológica en un momento determinado y activar una serie de procesos celulares (Bürkle, 2005; Schreiber et al., 2006)

De este modo una vez detectado el daño al ADN por la PARP se une al ADN, activándose e iniciándose la síntesis del polímero y ocasionando la modificación postraduccional de una serie de proteínas implicadas en la reparación del daño mediante la poli-ADP-ribosilación (D'Amours et al., 1999) haciéndola de esta forma más accesible a las proteínas que participan en el complejo de reparación del ADN. Además PARP también participa en el reclutamiento y regulación de las proteínas que forman parte de este complejo como ADN-polimerasa β y la ADN ligasa III (Leppard et al., 2003).

El daño del ADN activa la PARP, que a su vez agota la concentración intracelular de su sustrato NAD⁺, retardando la velocidad de la glucólisis, del transporte de electrones, como consecuencia disminuye los niveles de ATP y afecta el transporte de Ca²⁺. El Ca²⁺ desempeña papeles importantes como señalizador intracelular, un incremento de Ca²⁺ extracelular puede conducir a la muerte celular por activación de diferentes enzimas, endonucleasas, proteasas o fosfatasas (Figura 10).

En la necrosis todo el contenido celular escapa a los tejidos vecinos ocasionando una respuesta inflamatoria a su alrededor (Abdelkarim et al., 2001). Este proceso de necrosis y disfunción conlleva a determinadas circunstancias patológicas, tales como procesos inflamatorios e isquémicos (Figura 10) (Pieper, 1999a; Pieper, 1999b; Virág y Szabó, 2002). Una característica común a todos estos procesos relacionados con la inflamación (Figura 11) es la liberación de mediadores pro-inflamatorios y la formación de radicales libres como el ONOO⁻ que es un potente activador de PARP (Scott et al., 2004a).

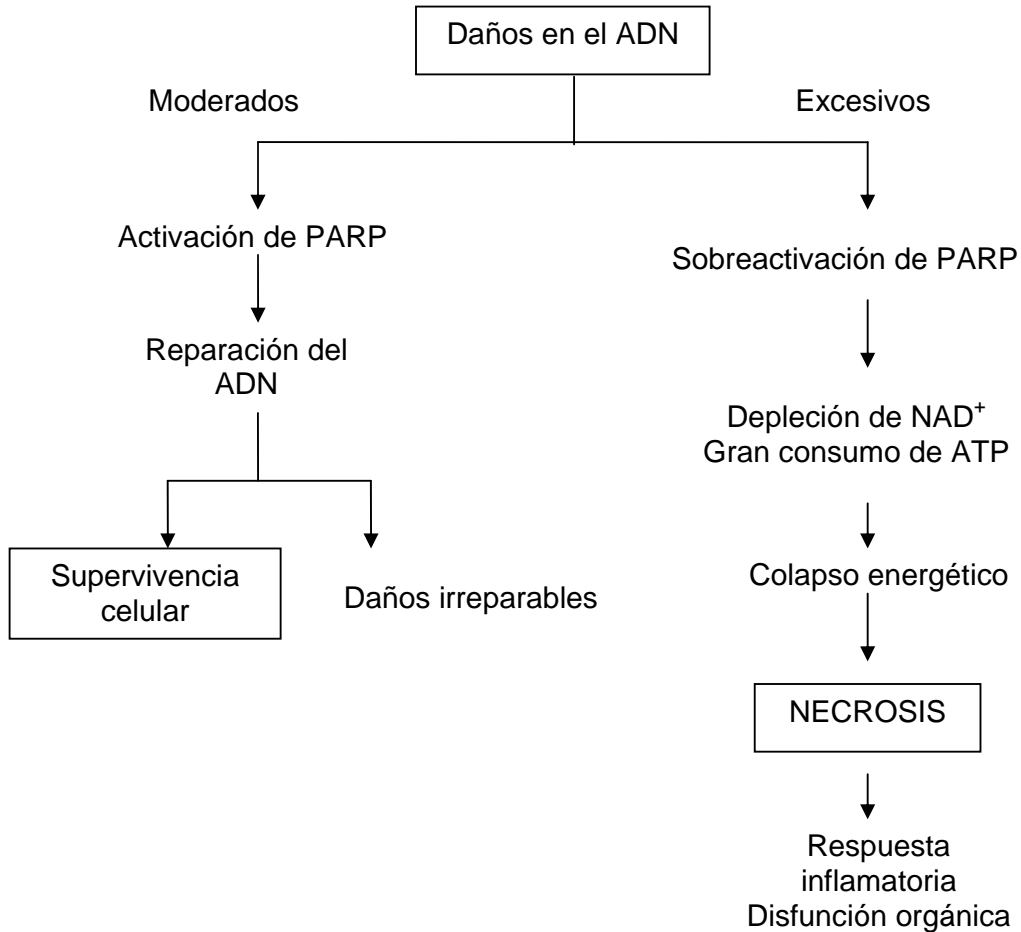


Figura 10. Esquema donde se muestra como se activa la PARP y conduce a la apoptosis.

Una moderada activación de PARP es beneficiosa en los procesos inflamatorios, no siendo conveniente su inhibición (Nagayama et al., 2000). Sin embargo ante elevadas concentraciones de oxidantes las células disparan otras rutas citotóxicas independientes de la PARP que ocasionan daños celulares importantes, pueden existir efectos citotóxicos sinérgicos entre la actividad de PARP y estos procesos celulares independientes de la PARP. En este caso la inhibición farmacológica de la PARP resulta en un tratamiento parcial que puede influir en la mejora de diversas patologías que involucran procesos inflamatorios.

1.11.1. N-(6-OXO-5,6-DIHIIDROFENANTRIDINA-2-IL)-N,N-DIMETILACETAMIDA ·HCL] (PJ34) COMO INHIBIDOR DE LA PARP

Los inhibidores de la PARP ejercen su acción a través de su unión al dominio catalítico de PARP, ocupando transitoriamente el centro de unión para NAD⁺, lo que se conoce como

inhibición competitiva. Existe hasta 170 fármacos inhibidores de PARP: derivados de quinazolininas, isoquinolininas y análogos, fenantridinonas y naftalimidinas (Banasik et al., 1992; Banasik y Ueda, 1994).

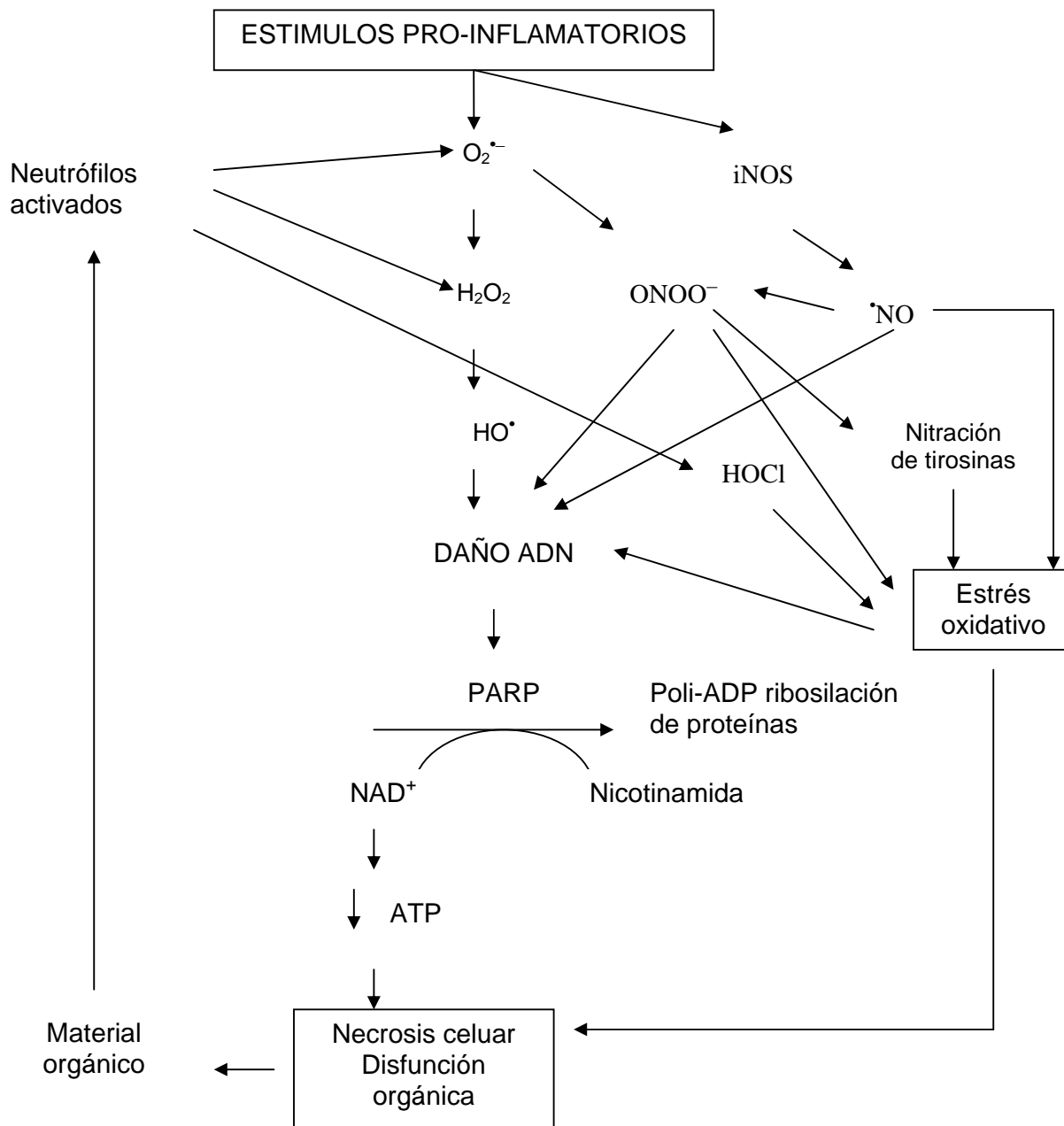


Figura 11. Esquema donde se muestra la relación entre el proceso inflamatorio, la activación de la PARP y el estrés oxidativo.

Un potente inhibidor que bloquea la actividad enzimática de la PARP debe poseer un anillo heterocíclico poliaromático rico en electrones (dador de electrones para el grupo amida) necesario para su unión a la zona del dominio catalítico en sustitución del NAD⁺. Además debe contar con la presencia de un grupo amida (-CONH₂) con al menos un protón sin sustituir y debe estar conjugado con diversos grupos aromáticos ricos en electrones para la

capacidad donadora de electrones al grupo amida. Un inhibidor selectivo de la PARP es el PJ34 (Szabó et al., 2006b).

El PJ34 cuyo nombre químico es: *N*-(6-Oxo-5,6-dihidrofenantridina-2-il)-*N,N*-dimetilacetamida·HCl] y su estructura química se muestra en la Figura 12

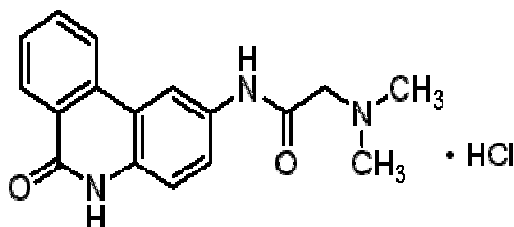


Figura 12. Estructura química del PJ34.

Es un derivado de las fenantridinonas, con un peso molecular de 331.80. Es soluble en agua (Scott et al., 2004b).

En varios procesos patológicos derivados de diferentes respuestas inflamatorias como en procesos de isquemia/reperfusión en cerebro, corazón, intestino y riñón, neuropatías y retinopatías inducidas por diabetes, en procesos de IRA (Irina et al., 2005, et al., Szabó et al., 2006a; Drel et al., 2006; Devalaraja-Narashimha et al., 2005), choque séptico, choque hemorrágico, diabetes, artritis reumatoide, lupus eritematoso, encefalomiелitis, enfermedad de Crohn, entre otras (Oliver, 1999; Szabó y Dawson, 1998; Virág y Szabó, 2002; Pacher et al., 2002) se ha demostrado que la PARP se encuentra activada. Por tanto la inhibición farmacológica de PARP por el uso de PJ34 o bien su bloqueo genético, confiere protección frente a estos fenómenos (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto del tratamiento con PJ34.		
EFEECTO AL INHIBIR A LA PARP	DOSIS	REFERENCIA
Efecto citoprotector <i>in vitro</i> y efecto protector en la isquemia-	Se administran varias dosis de 1-10 mg/kg i.p. de PJ34 durante el proceso de isquemia-reperfusión.	Jagtap et al., 2002

reperusión de la arteria mesentérica.	Las ratas son infectadas con el lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i> y recibieron 10 mg/kg i.p. de PJ34 1 hora antes y 1 hora después del tratamiento	
Reduce la inflamación intestinal y puede limitar la translocación bacteriana de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en el intestino.	Los conejos recibieron 40 mg/kg intravenoso (i.v.) de PJ34.	Lobo et al., 2005
Mejora la función cardíaca asociada con un choque séptico y se incrementa el número de animales sobrevivientes.	Se induce el daño cardíaco con el lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i> Recibieron 20 mg/kg i.p. de PJ34 diario por 10 semanas.	Pacher et al., 2002
Efectos antiinflamatorios en varios modelos de inflamación locales.	Se utilizaron varias dosis de PJ34 de 0.03-30.0 mg/kg en ratas y ratones sujetos a varios modelos estándares de inflamación.	Mabley et al., 2001
Efecto protector sobre el músculo esquelético sometido a isquemia-reperusión.	Los ratones recibieron 10mg/kg i.m. de PJ34 durante el procedimiento de isquemia-reperusión.	Conrad et al., 2006.
Confiere protección sobre el daño renal inducido por la isquemia-reperusión en la arteria torácica (TARS).	Las ratas recibieron 10 mg/kg i.p. de PJ34 una hora antes y después de la TARS.	Stone et al., 2005
Revierten las anomalías metabólicas y funcionales sobre la neuropatía diabética.	Las ratas recibieron 30 mg/kg/día por dos semanas de PJ34.	Li et al., 2004

El $K_2Cr_2O_7$ ha demostrado ser mutagénico en las células eucariotas y procariotas. Uno de los posibles mecanismos de genotoxicidad del $K_2Cr_2O_7$ sostiene que los niveles celulares de Cr^{6+} sobrepasan la capacidad de reducción del citoplasma, entonces éste migra directamente al núcleo y puede ser reducido *in situ* sin modificaciones citoplasmáticas, llevando a una producción de RL's muy cerca del ADN formando aductos Cr-ADN, entrecruzamientos ADN-ADN, ADN-proteína y ruptura de la cadena de ADN (Liu et al., 1999a y b). El Cr^{6+} puede

disminuir la replicación y fidelidad de la ADN polimerasa, fijándose directamente a los grupos tioles a lo largo de la enzima produciendo un daño oxidativo que la llevan a una inhibición. También puede alterar directamente la síntesis de ADN ya que puede disminuir los niveles de nucleótidos en el interior de la célula, por alteración de los receptores de membrana involucrados en la captación de nucleótidos (nucleótidos permeasas) o su captación por difusión facilitada, llevando a un imbalance de nucleótidos.

El Cr^{6+} es inductor de alteración de cromátidas hermanas, ruptura de las cromátidas, aberraciones cromosómicas, formación de sitios álcalsensibles y reacciones cruzadas dentro de la cadena de ADN. El mecanismo de muerte celular inducida por el Cr^{6+} en donde la célula muere por daño en el núcleo, se observa fragmentación de la cromatina, condensación citoplasmática con conservación de la membrana celular y los organelos citoplasmáticos, incluye daño en la síntesis del DNA y cambios en los ciclos celulares, mecanismo que parece estar relacionado con los cambios carcinogénicos (Jairo et al., 2004).

Por lo tanto en la IRA inducida por $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ la PARP probablemente se encuentra sobreactivada debido al proceso inflamatorio de la IRA y al daño al ADN debido al Cr^{6+} .

2. JUSTIFICACION

El modelo de IRA por $K_2Cr_2O_7$ es adecuado para el estudio de esta enfermedad ya que se sabe que se forman ERO en la toxicidad por $K_2Cr_2O_7$ y que dichas especies están involucradas en el daño que se observan en la IRA. El tratamiento con alfa tocoferol y glutatión han aminorado el daño renal inducido por el $K_2Cr_2O_7$ (Arreola-Mendoza et al., 2006 Chundawat y Sood, 2005).

Por otro lado la sobreactivación de la PARP ocurre en la IRA siendo responsable del daño renal. La inhibición de esta enzima ha tenido efectos benéficos en varios modelos como isquemia-reperfusión de la arteria torácica y nefropatías diabéticas en ratas (Stone et al., 2005; Szabó et al., 2006a). Por lo tanto es probable que la PARP este contribuyendo al daño renal inducido por $K_2Cr_2O_7$.

Lo anterior justifica la búsqueda de compuestos que no han sido explorados y que pudieran tener un efecto protector en la nefrotoxicidad inducida por $K_2Cr_2O_7$.

Los tres compuestos que se estudiaron son: (a) el ajo en polvo porque atrapa e inhibe la producción de ERO, (b) el ácido nordihidroguayarático (NDGA) porque es un compuesto que posee la capacidad de atrapar e inhibir la producción de ERO. Ambos compuestos inhiben la lipoperoxidación y (c) el PJ34, un inhibidor selectivo de la PARP.

3. HIPÓTESIS

Dado que el ajo en polvo y el NDGA poseen propiedades antioxidante y que existen evidencias de que las ERO participan en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ es posible que una alimentación suplementada con ajo en polvo y un tratamiento con NDGA prevengan o aminoren el daño renal inducido por este compuesto.

Por otro lado existen evidencias de que la sobreactivación de la PARP en la IRA está involucrada en el daño renal entonces al inhibir esta enzima utilizando PJ34 puede tener un efecto benéfico en el daño renal inducido por el $K_2Cr_2O_7$.

4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la dieta suplementada con ajo en polvo al 2% o las administraciones de NDGA y PJ34 inducen una mejoría en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- En la IRA inducida por el $K_2Cr_2O_7$ evaluar el efecto de la dieta suplementada con ajo en polvo al 2%, el NDGA y el PJ34 sobre:
 - a) las alteraciones en la función renal,
 - b) el daño estructural y
 - c) el estrés oxidativo.
- Estudiar la expresión y el papel funcional de la PARP en la IRA inducida por el $K_2Cr_2O_7$.

6. METODOLOGÍA

6.1. REACTIVOS Y EQUIPO

Los siguientes reactivos se compraron a Sigma-Aldrich Co. (St. Louis MO, EUA): glutatión reductasa, leupeptina, pepstatina A, aprotinina, dinitrofenilhidrazina (DNPH), guanidina-HCl, reactivo de Folín, adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), sulfato de estreptomicina, p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamínido, p-nitrofenol, albúmina sérica bovina (ASB), Tris-HCl, 1-metil-2-fenilindol, dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), ácido nordihidroguayarático (NDGA), dimetil sulfóxido (DMSO), Tritón X-100, hidroxitolueno butilado (BHT). De la marca Merck (Alemania) se compraron: citrato trisódico y azida de sodio. De la marca J.T. Baker (Xalostoc, México) se compraron: carbonato de sodio, ácido tricloroacético (TCA), ácido etilenediaminetetraacético disódico (EDTA), sales de fosfatos para los amortiguadores, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), alcohol etílico absoluto anhidro (etanol), alcohol metílico absoluto anhidro (metanol) y acetonitrilo. El *N*-(6-Oxo-5,6-dihidrofenantridina-2-il)-*N*, *N*-dimetilacetamida·HCl] (PJ34) se compró a Inotek Pharmaceuticals Cop. (Beverly, MA, EUA), el ajo en polvo fue de Tone Brothers Inc. (Ankeny, IA, EUA), el pentobarbital sódico fue de Pfizer (México). El anticuerpo monoclonal anti-4-hidroxinonenal (4-HNE) fue de Oxis International, Inc. (Portland, OR, EUA). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-3-NT se adquirió de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, EUA). El anticuerpo secundario anti-ratón IgG conjugado con biotina se adquirió de Jackson ImmunoResearch, Laboratories, Inc. (West Grove, PA, EUA). El H_2O_2 fue de Mallinckrodt Baker Inc. (Xalostoc, México). El estuche ABC-kit Vectastain se compró a Vector Laboratories (Orton Southgate, Peterborough, UK). La diaminobenzidina, la hematoxilina de Mayer (Lilie's Modification) y la eosina se compraron a DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EUA). El anticuerpo monoclonal pADPRr de ratón se compró a Biomol Internacional LP (Plymouth Meeting, PA, EUA).

Se utilizaron estuches comerciales Sera-pak plus para medir los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN) y creatinina que se compraron a Bayer (Tarrytown, NY, EUA).

Las bombas miniosmóticas Alzet modelo 2001 se compraron a Durect Corporation (Cupertino, CA, Model 2004, EUA).

Se utilizó el siguiente equipo:

- Un homogenizador tipo politrón Brinkman modelo PT2000.
- Una centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-21.
- Un espectrofotómetro Beckman modelo DU-640 series.
- Un autoanalizador Bayer RA1000.
- Microtomo de rotación Leica RM 2145.
- Microscopio de luz Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

6.2. ANIMALES Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 200-230 g de peso (del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM), que se mantuvieron durante todo el tratamiento en jaulas metabólicas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 horas, con alimentación y agua *ad libitum*.

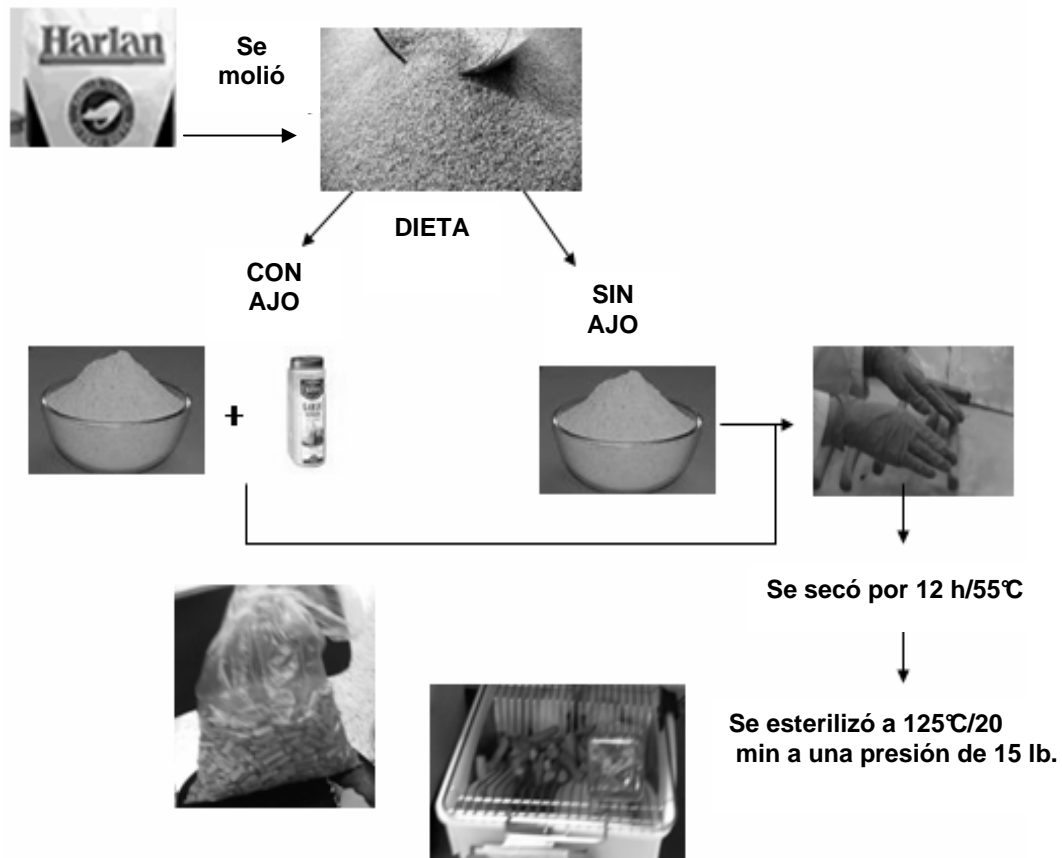
6.3. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

En estudios previos se ha demostrado que la administración única de 15 mg/kg s.c. de $K_2Cr_2O_7$ causa IRA en ratas y que 48 h después de administrado el tóxico se observa el mayor daño estructural y oxidativo (Barrera et al., 2003a, Barrera et al., 2003b; Arreola-Mendoza et al., 2006; Pedraza-Chaverrí et al., 2005). El $K_2Cr_2O_7$ se disolvió en solución salina estéril (SSI) a una concentración de 15 mg/mL.

Esquema 1: Se estudió el efecto de una dieta suplementada de ajo en polvo al 2% en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$. Los animales recibieron una dieta suplementada con ajo en polvo al 2% (Pedraza-Chaverrí et al., 2000). El procedimiento que se utilizó para preparar la dieta se muestra en el Esquema 1. Se utilizó como dieta control el alimento comercial para rata de la marca Harlan Tekad (No. catálogo 2010S).

Se utilizaron 10 ratas que recibieron una dieta suplementada con ajo en polvo al 2% y 10 ratas que recibieron una dieta normal durante 33 días. Los animales se mantuvieron en cajas colectivas con ciclos artificiales de luz/oscuridad de 12 horas hasta el día 29. En este día las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales y al día 31 se administró a cada grupo SSI o $K_2Cr_2O_7$ como se indica a continuación:

1. Grupo CT (n = 5): recibieron 0.2 mL de (SSI) s.c y una dieta normal.
2. Grupo $K_2Cr_2O_7$ (n = 5): se administró una dosis única de 15 mg/kg s.c. de $K_2Cr_2O_7$ y una dieta normal.
3. Grupo AJO (n = 5): recibieron 0.2 mL de SSI s.c. y una dieta suplementada con ajo al 2%.
4. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +AJO (n =5): se administró una dosis de 15 mg/kg s.c. de $K_2Cr_2O_7$ y recibieron una dieta suplementada con ajo en polvo al 2%.



Esquema 1. Procedimiento de preparación de la dieta.

Esquema 2: Se estudió el efecto del NDGA en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$.

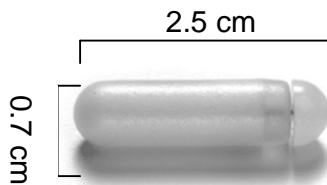


Figura 13. Bomba miniosmótica.

El NDGA se disolvió en DMSO a una concentración aproximada de 0.58 g/mL. El NDGA (17 mg/kg/día) (Floriano-Sánchez et al., 2006) se administró subcutáneamente (24 h antes de administrar el $K_2Cr_2O_7$) mediante una bomba miniosmótica que permitió una liberación constante de 0.25 μ L/h por 28 días. Para condicionar las bombas miniosmóticas, cuatro de ellas se colocaron en un frasco cubierto de la luz que contenía SSI y se incubaron a 37°C por 48 horas. Con ayuda de unas pinzas se tomó una de las bombas miniosmóticas y se insertó una jeringa con el fin de extraer la SSI y el aire contenidos en la bomba. Posteriormente, con ayuda de una jeringa para insulina (con una aguja 27G x 1/2"), se llenaron con 0.2 mL de la solución de NDGA recién preparada. Se repitió el mismo procedimiento para las tres bombas restantes, tomando en cuenta que dos de ellas contenían sólo el vehículo (DMSO; 33.16 mg/mL). Para colocar la bomba debajo de la piel, cada rata se anestesió con pentobarbital sódico diluido (1:1 v/v) con SSI administrando 0.1 mL/100 g por vía i.p., luego se rasuró la parte dorsal de la rata cercana a la cabeza y se hizo

Para colocar la bomba debajo de la piel, cada rata se anestesió con pentobarbital sódico diluido (1:1 v/v) con SSI administrando 0.1 mL/100 g por vía i.p., luego se rasuró la parte dorsal de la rata cercana a la cabeza y se hizo

una pequeña incisión, con ayuda de unas pinzas se separaron la piel y el músculo para colocar la bomba miniosmótica y se suturó la herida. Al cuarto día se extrajo la bomba, se lavó con SSI y se le colocó a otra rata. Este último paso se repitió hasta cumplir con los 28 días.

Para la realización de este esquema se utilizaron 52 ratas que se colocaron en jaulas metabólicas y se formaron los siguientes grupos:

1. Grupo CT (n = 11): recibieron 0.2 mL de SSI s.c.
2. Grupo $K_2Cr_2O_7$ (n = 16): recibió una dosis única de 15 mg/kg s.c. de $K_2Cr_2O_7$.
3. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +NDGA (n = 15): se administraron 17 mg/kg s.c. de NDGA 24 h antes de administrar una dosis única de 15 mg/kg s.c. de $K_2Cr_2O_7$. La administración de NDGA (mediante el uso de la bomba minosmótica) se realizó durante 4 días.
4. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +DMSO (n =10): se administraron 30 mg/kg s.c. de DMSO 24 h antes de administrar una dosis única de 15 mg/kg s.c. de $K_2Cr_2O_7$... La administración de DMSO (mediante el uso de la bomba minosmótica) se realizó durante 4 días.

Esquema 3: Se estudió el efecto del PJ34 en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$, para ello se utilizaron 35 ratas que se colocaron en jaulas metabólicas y se formaron los siguientes grupos:

1. Grupo CT (n = 11): se administraron 0.2 mL de SSI s.c.
2. Grupo $K_2Cr_2O_7$ (n = 12): recibieron una dosis única de 15 mg/kg s.c de $K_2Cr_2O_7$.
3. Grupo $K_2Cr_2O_7$ +PJ34 (n = 12): recibieron una dosis de 15 mg/kg i.p. de PJ34 (Mabley et al., 2001; Li et al., 2004; Stone et al., 2005) 1 hora antes de administrar el $K_2Cr_2O_7$ (15 mg/kg s.c.) y 6 dosis adicionales de 15 mg/kg 1, 5, 24, 26, 31 y 46 horas después de la administración de $K_2Cr_2O_7$. La solución de PJ34 se preparó a una concentración de 15 mg/mL en SSI.

Durante todo el tratamiento, cada día se registró el peso de los animales y se recolectó su orina. Los animales de los grupos tratados con $K_2Cr_2O_7$ fueron sacrificados 48 h después de la administración del nefrotóxico mediante decapitación.

6.4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Orina: la orina total de 24 horas se centrifugó a 3,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se separó en alícuotas de aproximadamente 1 mL, se congeló y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Suero: la sangre se recolectó en tubos de vidrio de 13 x 100 mm se dejó coagular a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos). Después de centrifugar a 3,000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, se separó el suero en alícuotas de aproximadamente 200 µl que se congelaron y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

Riñón: se extrajeron los riñones de cada una de las ratas, se cortaron transversalmente en 5 secciones (una de estas secciones se colocó en formalina al 10%) y el resto se colocó en papel aluminio para congelarlas inmediatamente con nitrógeno líquido y luego inmediatamente a -80°C hasta su uso.

Homogenado renal con inhibidores de proteasas: De los cortes transversales congelados de riñón completo se pesó 0.1 g de tejido para preparar homogenados 1:10 (p/v) en 0.9 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, que contenía EDTA sódico 1 mM, tritón X-100 al 0.1% e inhibidores de proteasas: leupeptina (5 µg/mL), pepstatina A (7 µg/mL) y aprotonina (5 µg/mL). Se empleó un homogenizador tipo politrón durante 10 segundos. Éste homogenado se centrifugó a 20,937 x g por 20 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante.

Homogenado para medir malondialdehído: Se preparó de la forma antes mencionada 1:10 (p/v) en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.4 y con 20 µL de hidroxitolueno butilado (BHT) 0.5 M. Este homogenado se centrifugó a 2,236 x g por 10 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry et al. (1951).

Cortes histológicos: El corte de riñón colocado en formalina al 10% se sometió a deshidrataciones graduales para luego incluirse en parafina y mediante el uso del microtomo se prepararon cortes histológicos de 3 µm de grosor.

6.5. DETERMINACIONES

6.5.6. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

6.5.6.1. NITRÓGENO DE UREA EN SANGRE (BUN)

La concentración de urea en sangre se determinó mediante un ensayo colorimétrico utilizando un estuche comercial. Este ensayo es una adaptación de la reacción propuesta por Jung et al. (1975), que consiste en la formación en medio ácido de un complejo colorido orto-ftaldehído-urea que absorbe a 510 nm (Figura 14):

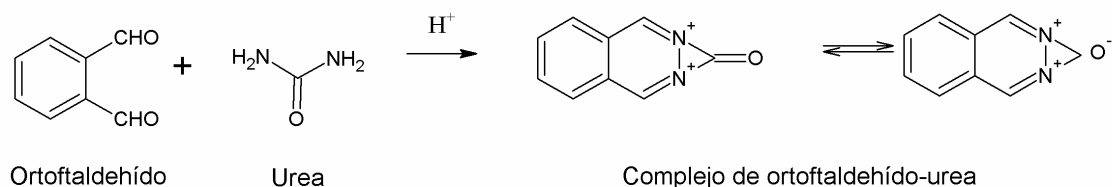
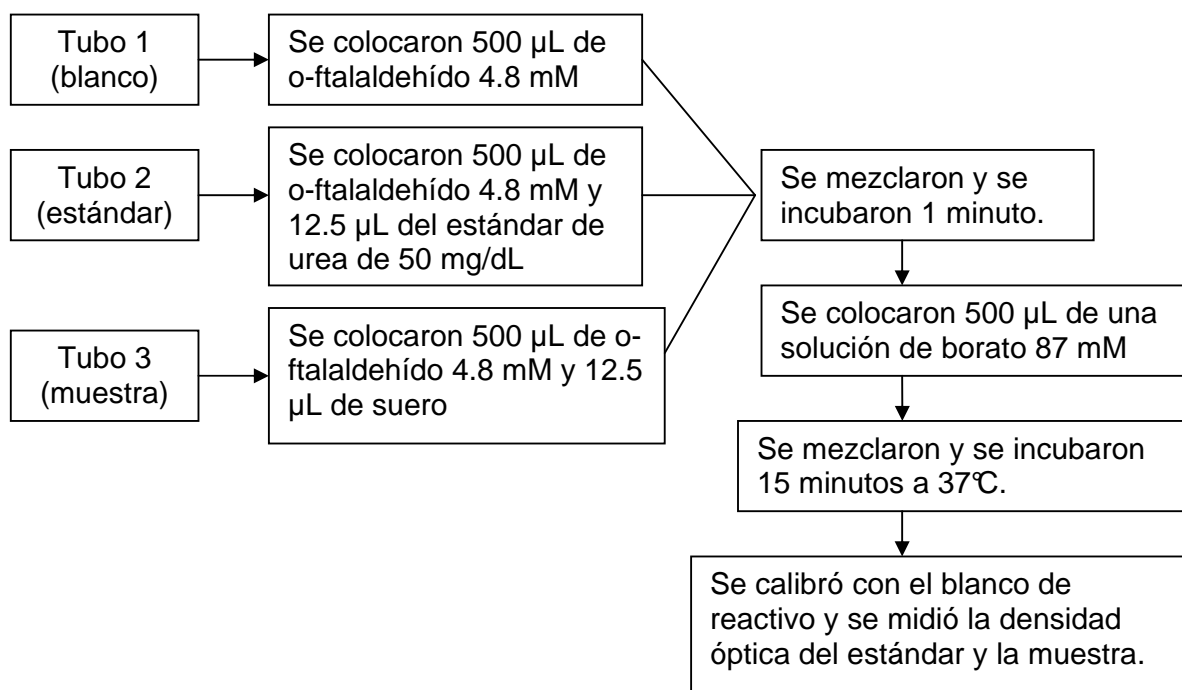


Figura 14. Reacción propuesta por Jung et al., (1975).

El procedimiento se muestra en el esquema 2.



Esquema 2. Procedimiento para medir la concentración de urea en sangre.

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.

6.5.6.2. CONCENTRACIÓN DE CREATININA EN SUERO

La creatinina presente en el suero y la orina se determinó mediante un ensayo colorimétrico con un estuche comercial en un autoanalizador mediante la reacción de Jaffé (Chinn et al., 1978, Lamb et al., 2005) basado en la formación en medio alcalino de un complejo colorido picrato-creatinina que absorbe a 492 nm (Figura 15):

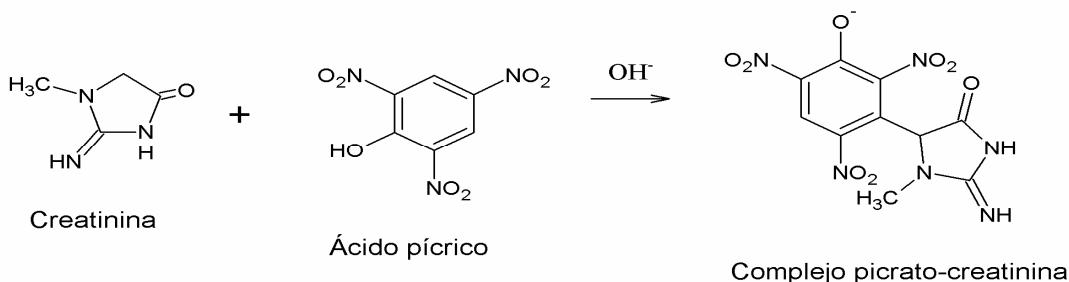
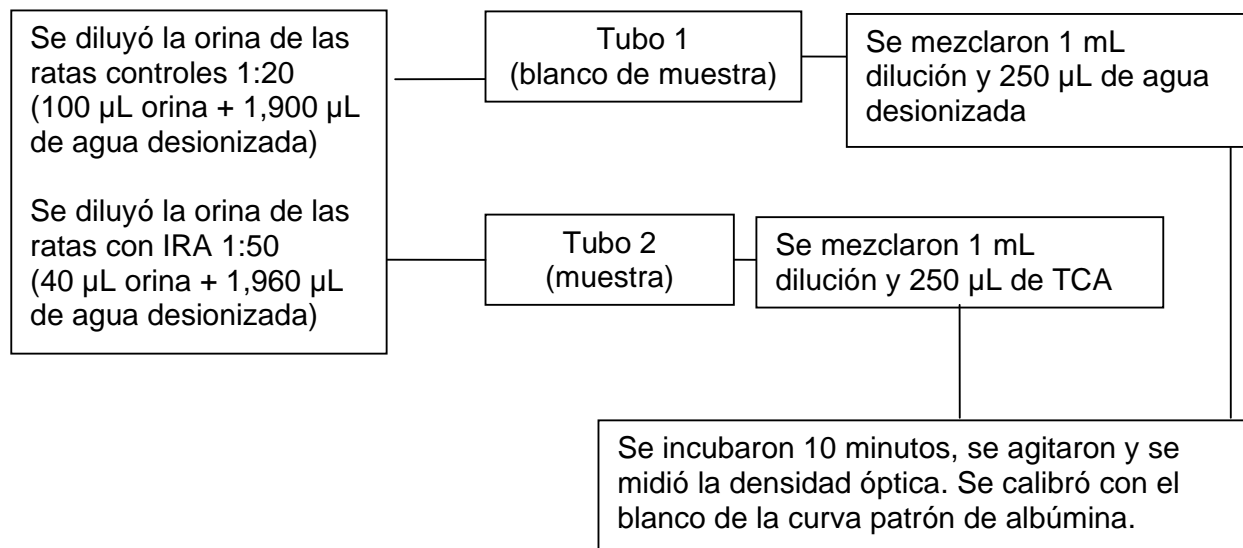


Figura 15. Reacción de Jaffé (Chinn et al., 1978)

La concentración de creatinina se expresó en mg/dL.

6.5.6.3. PROTEINURIA

La concentración de proteínas totales excretadas por la orina se determinó por turbidimetría a 420 nm después de su precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 12.5% (Pedraza Chaverrí et al., 1999). El procedimiento se muestra en el esquema 3.



Esquema 3. Procedimiento para medir proteínas totales en orina (Pedraza Chaverrí et al., 1999).

Los resultados de densidades ópticas 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.

6.5.6.4. EXCRECIÓN URINARIA DE N-ACETIL- β -D-GLUCOSAMINIDASA (NAG)

La actividad de NAG se determinó mediante el ensayo de conversión de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamínido (sustrato) en N-acetil-D-glucosa y p-nitrofenol (Figura 16). El p-nitrofenol en medio alcalino pasa de su forma protonada a su forma aniónica (Jung et al., 1991). La metodología experimental se muestra en el esquema 4.

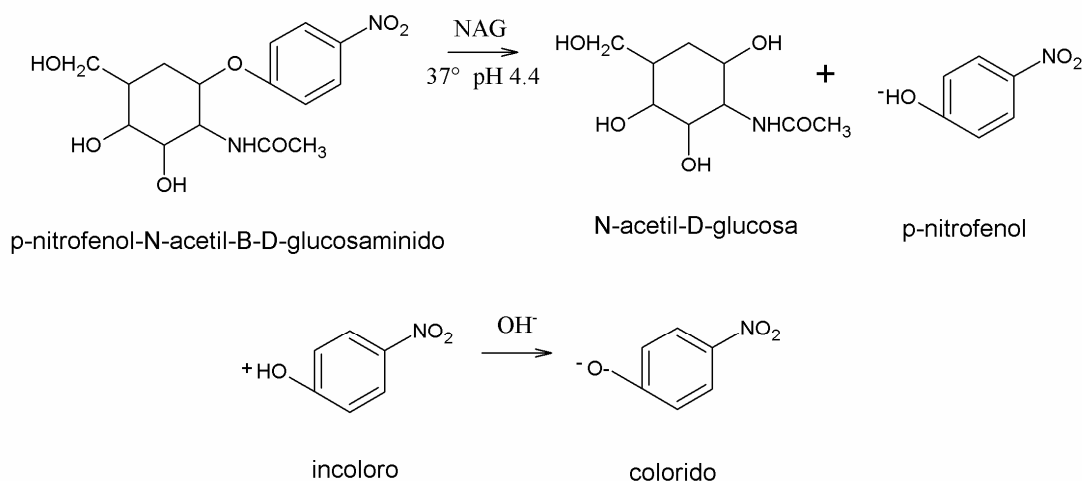
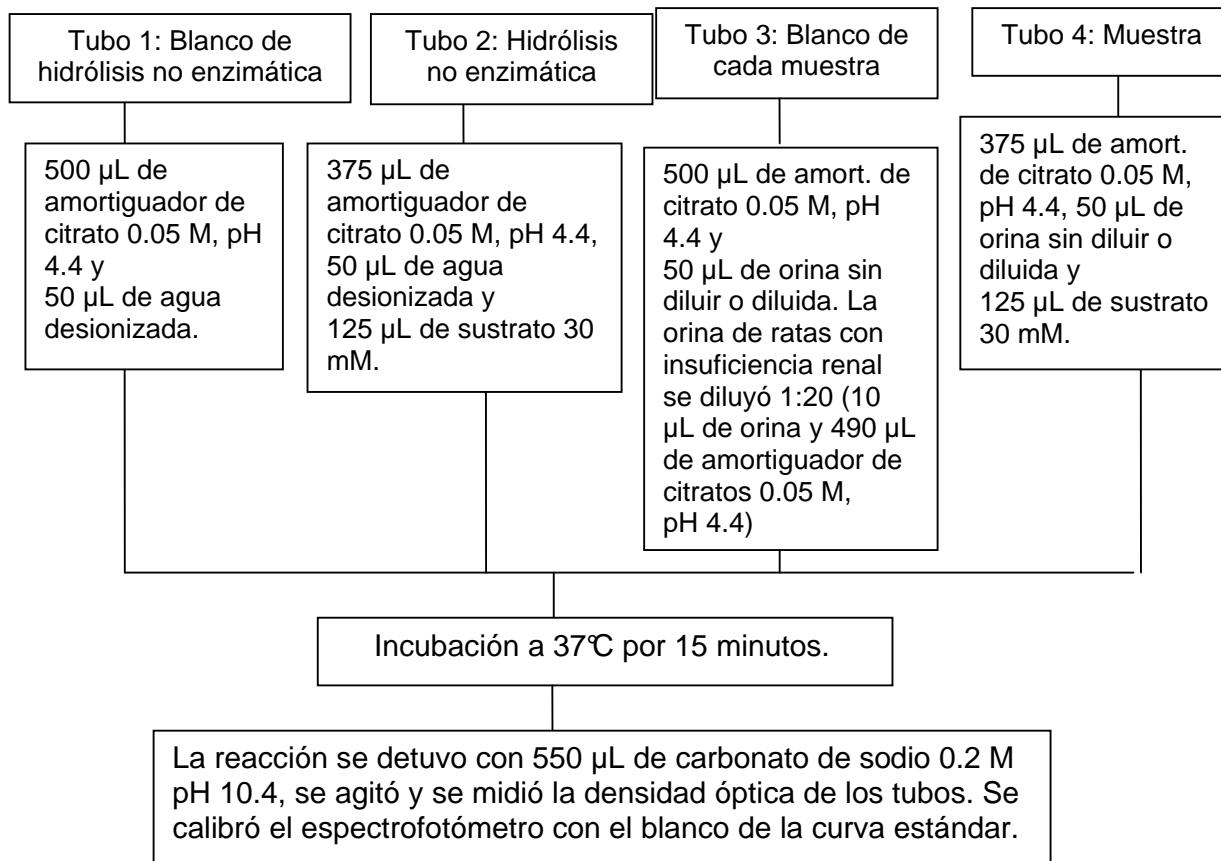


Figura 16. Reacción de la NAG con el p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminido (Jung et al., 1991).

El p-nitrofenol protonado es incoloro y en medio alcalino en su forma aniónica presenta color y absorbe a 405 nm. Los resultados de las densidades ópticas 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 de ensayo.

6.5.6.5. ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) EN SUERO

La actividad de esta enzima se midió indirectamente por el método de Lawrence y buró, (1976) por medio de un par de reacciones en las que en presencia de H_2O_2 se produce glutatión oxidado (GSSG), el cual a su vez es reducido por la glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor. Ya que el NADPH absorbe a 340 nm, la reacción se basa en la disminución de la densidad óptica por la desaparición de NADPH (Figura 17). El procedimiento se observa en el esquema 5. Los resultados se expresaron en U/mL donde 1 U es la cantidad de la enzima que oxida 1 μmol de NADPH/min.



Esquema 4. Procedimiento para medir la actividad enzimática de la NAG.

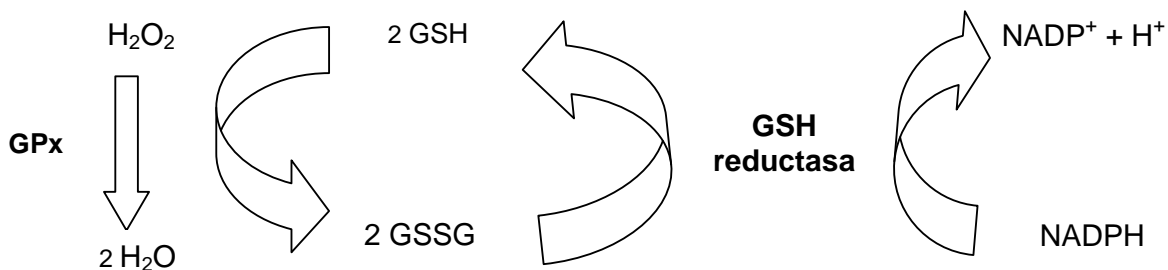


Figura 17. Reacción de la glutatión peroxidasa (Lawrence y Burk, 1976).

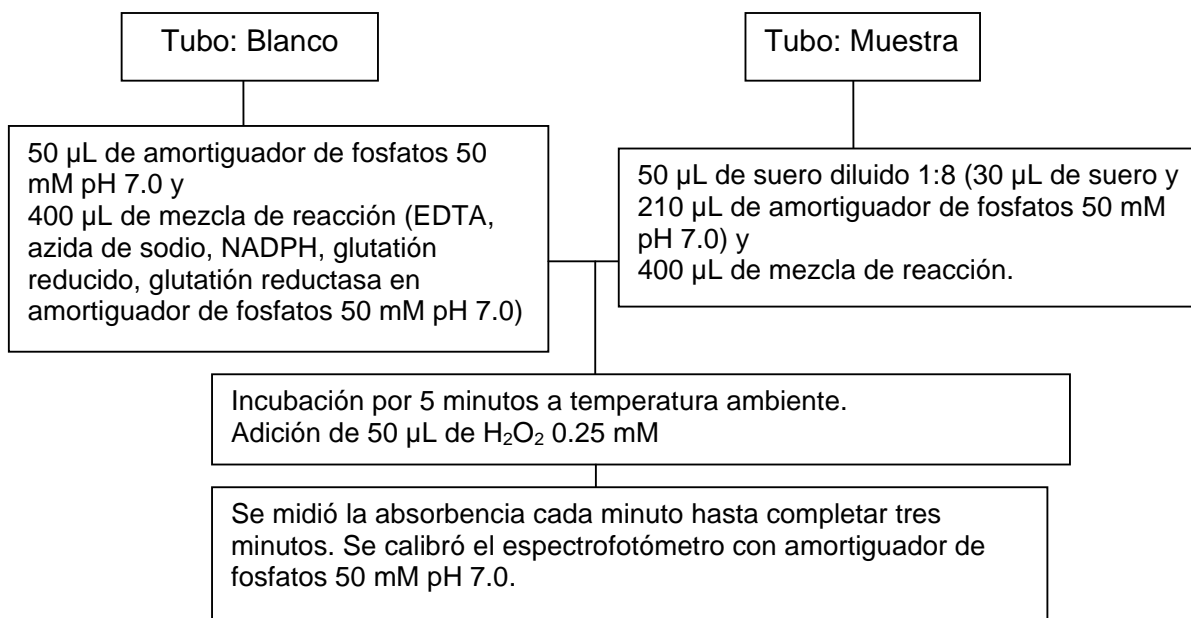
6.5.6.6. EXCRECIÓN URINARIA DE GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST)

La actividad de GST se midió por el método de Habig et al. (1974). En donde el glutatión reducido (GSH) forma un conjugado con el 1 cloro-2,4-dinitrobenceno (CNDB) que absorbe a 340 nm (Figura 18).

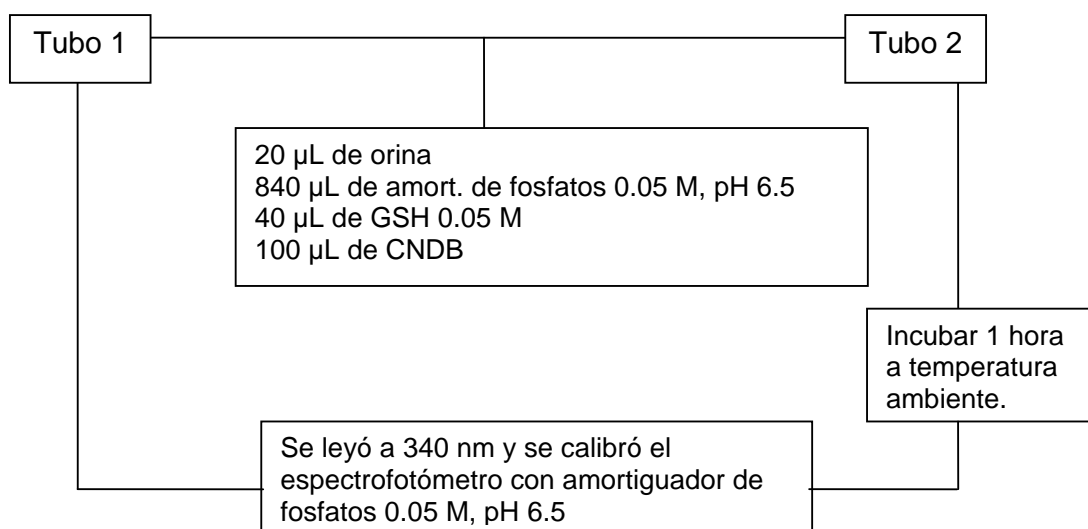


Figura 18. Reacción entre el glutatión reducido y el 1, cloro-2,4,dinitrobenceno (Habig et al., 1974).

Se siguió el procedimiento que se muestra en el esquema 6. Tomando en cuenta el volumen urinario de 24 horas, el resultado se expresó como unidades de conjugado formado/24h, usando el coeficiente de extinción molar del conjugado: 9.6 mmolcm^{-1} . La unidad del conjugado se define como la cantidad de enzima que libera $1 \mu\text{mol}$ de conjugado/min bajo las condiciones de ensayo.



Esquema 5. Procedimiento para medir la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).



Esquema 6. Procedimiento para medir la actividad de la glutatión S-transferasa en orina (GST).

6.5.6.7. HISTOLOGIA

Tinción con hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos se desparafinaron con 2 lavados de xilol de 5 minutos y un tercer lavado con una mezcla de xilol-alcohol (1:1) 5 minutos, se rehidrataron con lavados de 5 minutos con alcohol al 100% y al 96% y un último lavado con agua. Se tiñeron los tejidos con hematoxilina durante 10 minutos, posteriormente se lavaron con agua y con una solución de HCl al 1% en etanol al 70%. Posteriormente se colocaron las muestras en carbonato de litio al 0.1% y se tiñeron con eosina durante 15 segundos. Después se lavaron con agua y los cortes ya teñidos se deshidrataron con lavados de 5 minutos con alcohol al 96% y al 100%, posteriormente se lavaron tres veces por 5 minutos con xilol. Se colocó resina soluble en xilol sobre la muestra y se colocó un cubreobjetos. Esta tinción se realiza para observar las estructuras del tejido, la hematoxilina es una base que tiñe regiones ácidas de color azul como el núcleo y la eosina es un ácido que tiñe regiones básicas del citoplasma de color rosa (Orozco-Ibarra et al., 2007).

Tinción de PAS (ácido peryódico-Schiff). Los cortes histológicos desparafinados y rehidratados se tiñeron con ácido peryódico, que oxida los polisacáridos no sustituidos, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas y glucoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos de la membrana epitelial tubular, por 5 minutos y se lavaron con agua destilada. Posteriormente el tejido se incubó con el reactivo de Schiff por 15 minutos, se lavó con agua destilada y se tiñó para contrastar con hematoxilina por 30 segundos (Zheng et al., 2007; Velasco-Velazquez et al., 1998).

Para el análisis histológico, se fotografiaron 5 campos al azar por cada rata de riñón y se analizaron usando el software KS-300 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) que selecciona las áreas dañadas (con hinchazón, vacuolización citoplásmica, descamación y necrosis) por campo. Los resultados se expresaron como el porcentaje del área tubular dañada.

6.7. EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO

6.7.1. 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 en medio ácido (Figura 19).

Los resultados de densidades ópticas se interpolaron en una curva patrón de tetrametoxipropano hasta 23.68 μM . El resultado se expresó como nmoles MDA/mg de proteína. El procedimiento se muestra en el esquema 7.

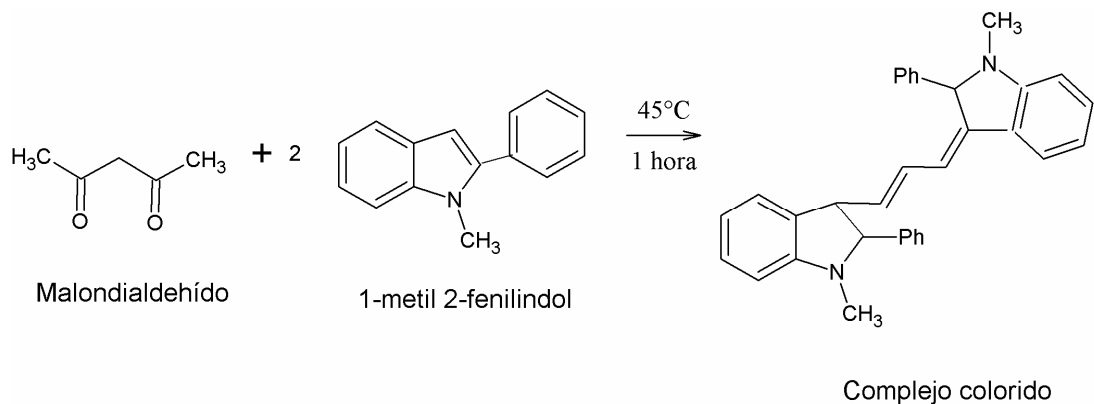
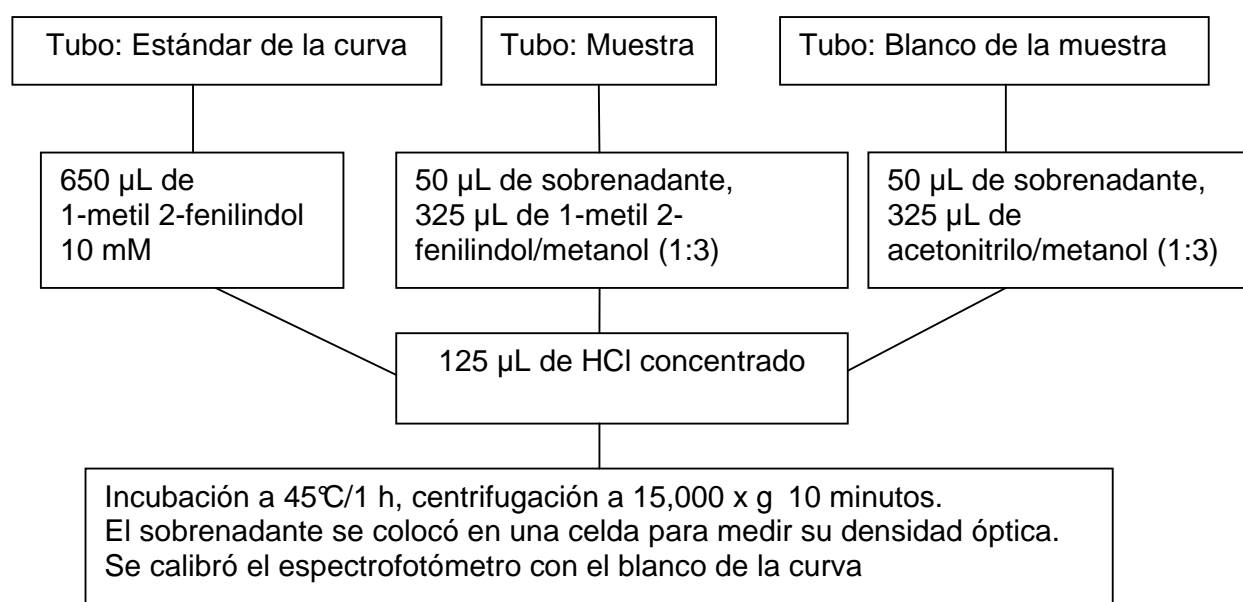


Figura 19. Reacción del malondialdehído con el 1-metil-2-fenilindol (Gerard-Monnier et al., 1998).



Esquema 7. Procedimiento para medir lipoperoxidación en tejido renal.

6.7.2. CONTENIDO TOTAL DE GRUPOS CARBONILO EN PROTEÍNAS

Para determinar la cantidad de proteínas oxidadas se utilizó un método colorimétrico que se basa en la reactividad de los grupos carbonilo con la 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH) para formar un complejo proteína-hidrazona que absorbe a 370 nm (Reznick y Packer, 1994).

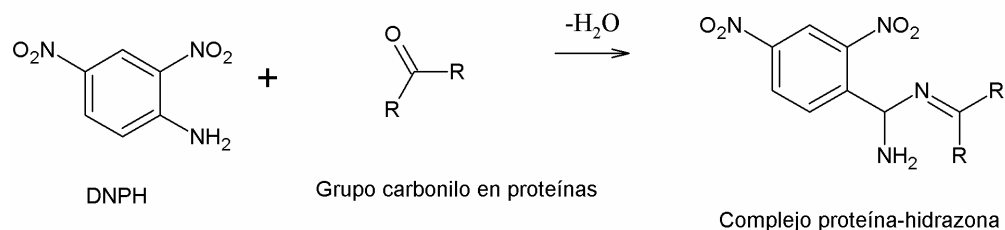
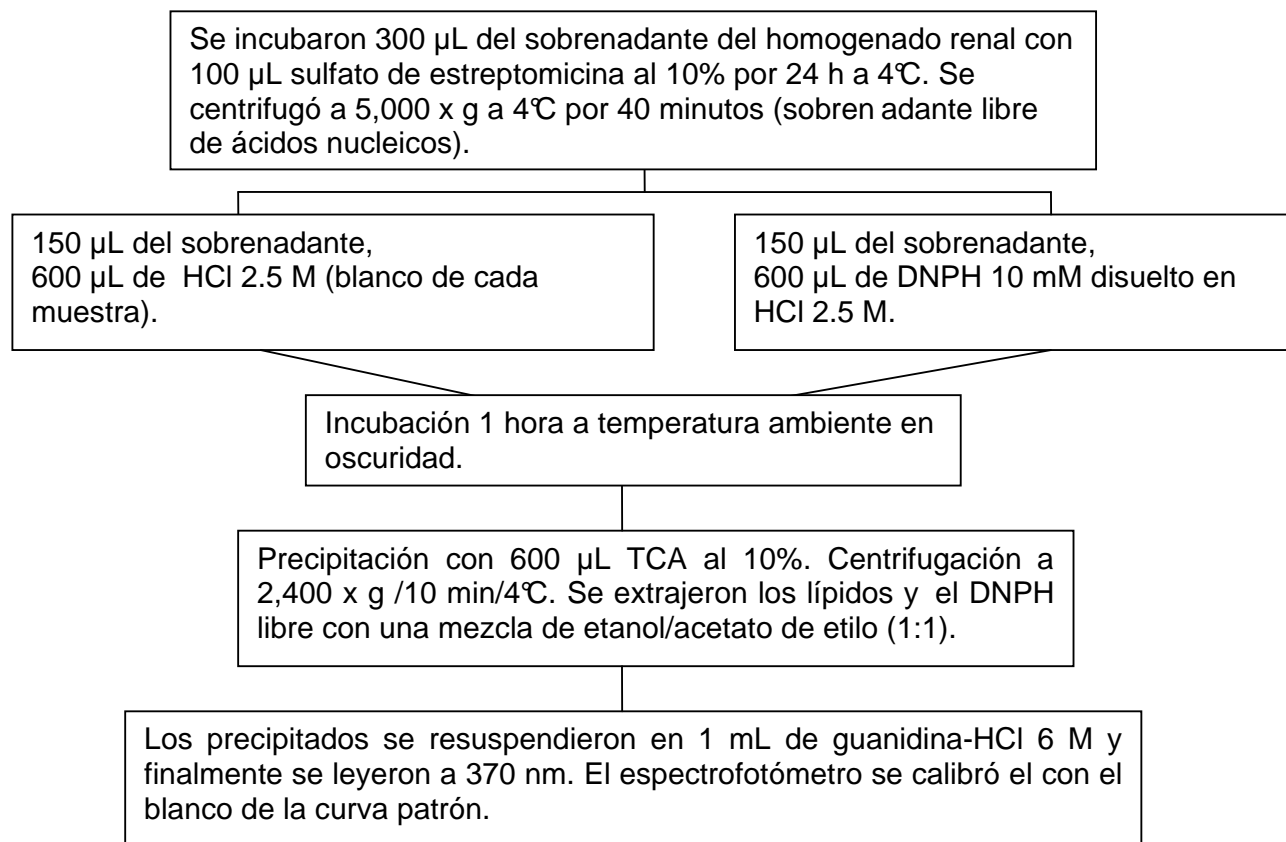


Figura 20. Reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazona con el grupo carbonilo en las proteínas (Reznick y Packer, 1994).



Esquema 8. Procedimiento para medir el contenido total de grupos carbonilo en las proteínas.

El procedimiento experimental se muestra en el esquema 8. 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.

6.7.3. CUANTIFICACIÓN DE 3-NITROTIROSINA (3-NT), 4-HIDROXINONENAL (4-HNE) Y POLI (ADP-RIBOSA) (pADPr) POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la inmunohistoquímica, los cortes renales ($3 \mu\text{m}$) fueron desparafinados y calentados en amortiguador para liberar los sitios antigénicos. La actividad de peroxidasa endógena se inhibió con H_2O_2 al 0.03% en metanol absoluto. Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución de anti 3-NT (1:70), anti 4-HNE (1:200) y anti-pADPr (1:200) en amortiguador salino de fosfatos. Se lavaron las muestras con PBS para remover el anticuerpo primario. Las muestras se incubaron con una dilución 1:500 de anticuerpo secundario anti-ratón-IgG biotinilado. El complejo se detectó con una peroxidasa acoplada a avidina-biotinina (ABC-kit, Vectastain) utilizando diaminobenzidina como revelador que

muestra una coloración café. Después se lavó con PBS y se tiñó con hematoxilina y eosina (Orozco-Ibarra et al., 2007; Sánchez-González et al., 2004).

Para el análisis inmunohistoquímico, se fotografiaron 5 campos al azar por cada riñón de rata y se analizaron usando el software KS-300 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) que selecciona las áreas de color café por campo con una amplificación de 100X (el área total $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). Todos los cortes fueron incubados bajo las mismas condiciones con la misma cantidad de anticuerpo para poder hacer la comparación. Como control negativo se usó el suero de cabra preinmune sustituyendo al anticuerpo primario (Orozco-Ibarra et al., 2007; Sánchez-González et al., 2004). Todas las muestras fueron examinadas en el microscopio de luz.

6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se reportaron como la media \pm error estándar de la media. Los datos se analizaron con el programa Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) usando la prueba de ANOVA y comparaciones múltiples con el método de Bonferroni. La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar los datos de histología. Las diferencias se consideraron significativas a valores de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. ESQUEMA 1: EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON UNA DIETA SUPLEMENTADA CON AJO EN POLVO AL 2% SOBRE LA IRA INDUCIDA CON $K_2Cr_2O_7$

El grupo alimentado con la dieta suplementada con ajo en polvo al 2% no mostró diferencias con el grupo control en ninguno de los parámetros evaluados, es decir la ingesta de ajo no tuvo efecto alguno en esos parámetros.

7.1.1. PESO CORPORAL Y VOLUMEN URINARIO. El $K_2Cr_2O_7$ no tuvo efecto alguno sobre el peso corporal de las ratas y el volumen urinario (Figura 21).

7.1.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL. La insuficiencia renal se determinó utilizando varios marcadores: BUN, creatinina en suero, proteinuria, excreción urinaria de NAG, actividad de GPx en suero y la excreción urinaria de GST. La administración de $K_2Cr_2O_7$ provocó disfunción renal significativa lo que se reflejó en:

- Aumento de BUN y de creatinina en suero (Figuras 22A y B).
- Aumento en la proteinuria y disminución de la actividad de GPx en suero (Figuras 23A y B).
- Aumento en la excreción urinaria de NAG y GST (Figuras 24A y B)

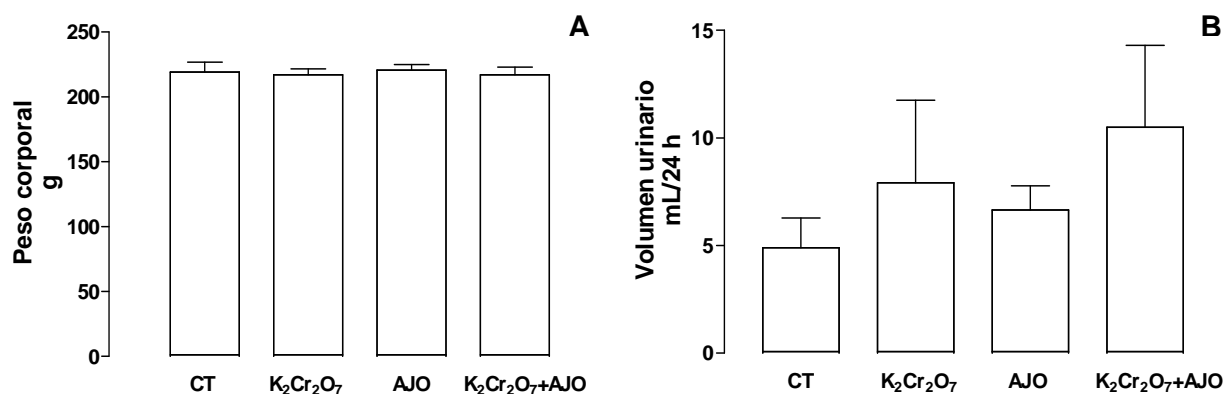


Figura 21. Efecto del $K_2Cr_2O_7$ y del ajo sobre (A) el peso corporal de las ratas y (B) sobre el volumen urinario en ratas normales y con IRA (n = 5).

El tratamiento con ajo en el grupo de $K_2Cr_2O_7$ +AJO previno parcialmente el incremento de BUN en un 34% (Figura 22A), de igual forma previno en un 41% el incremento de la concentración de creatinina en suero (Figura 22B), en un 53% la excreción urinaria de NAG (Figura 24A) y en un 57% la proteinuria (Figura 23A). El ajo también aumentó la actividad de

GPx en suero en un 50% (Figura 23B) y previno totalmente el incremento de la excreción urinaria de GST (Figura 24B).

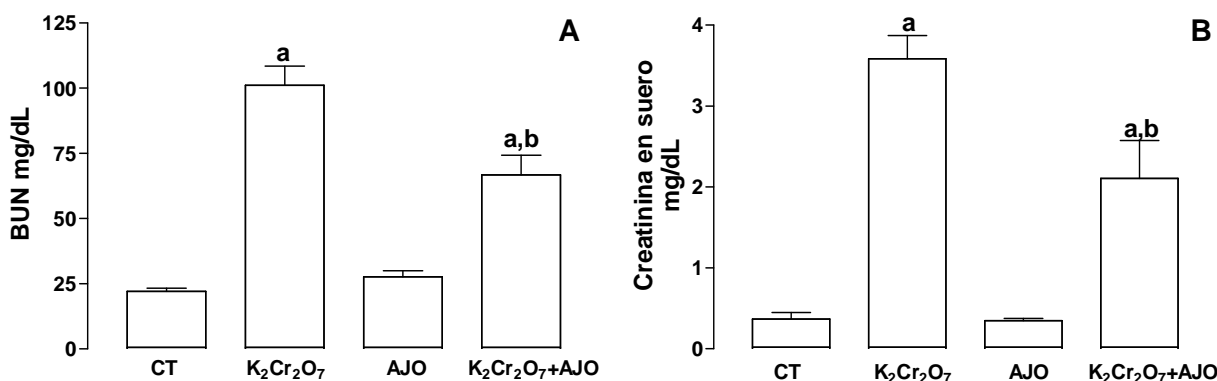


Figura 22. Efecto del K₂Cr₂O₇ y del ajo sobre (A) la concentración de nitrógeno de urea en sangre (BUN) (n = 5) y (B) la concentración de creatinina en suero de ratas normales y con IRA (n = 5). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap<0.001 vs. CT y ^bp<0.01 vs. K₂Cr₂O₇.

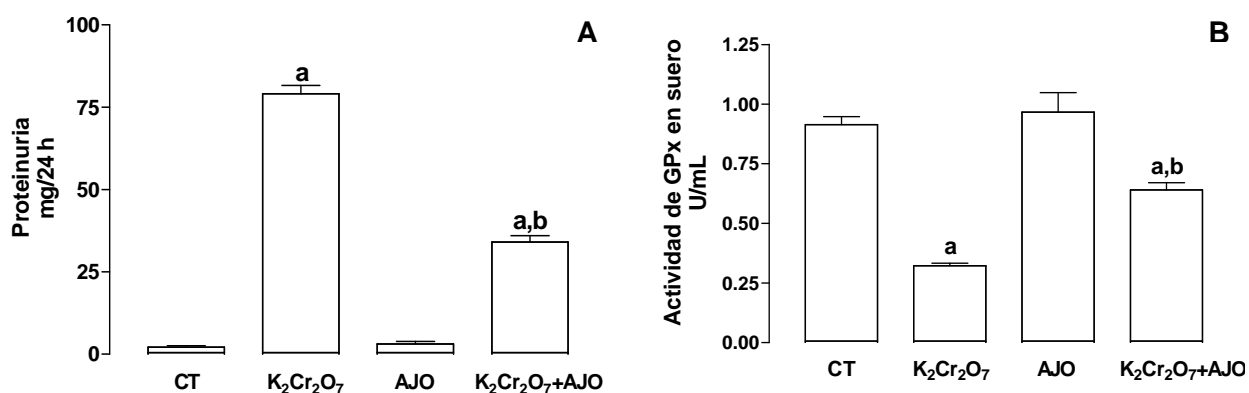


Figura 23. Efecto del K₂Cr₂O₇ y del ajo sobre (A) la excreción de proteínas en orina (n = 4-5) y (B) la actividad de GPx en suero de ratas normales y con IRA (n = 5). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap <0.001 vs. CT y ^bp<0.001 vs. K₂Cr₂O₇.

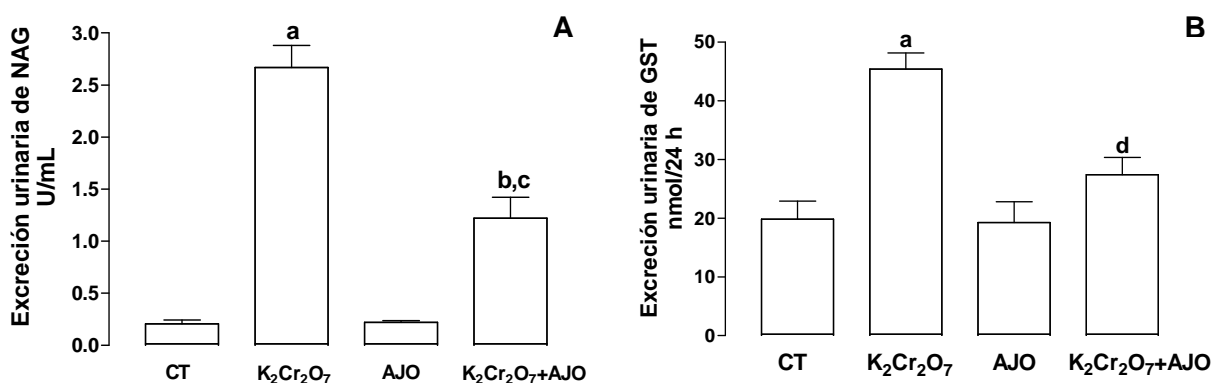


Figura 24. Efecto del K₂Cr₂O₇ y del ajo sobre (A) la excreción urinaria de NAG (n = 3-5) y (B) la excreción urinaria de GST en ratas normales y con IRA (n = 5). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap<0.001 y ^bp<0.05 vs. CT, ^cp<0.001 y ^dp<0.01 vs. K₂Cr₂O₇.

7.1.3. HISTOLOGIA. La histología del tejido renal en los 4 grupos experimentales se presenta en la Figura 25. El grupo administrado con $K_2Cr_2O_7$ presenta daño estructural extenso en los túbulos proximales en donde se puede apreciar la presencia de vacuolas y zonas de necrosis. Por otra parte en el grupo de $K_2Cr_2O_7$ +AJO se observó una disminución de células tubulares dañadas y menos lesiones tisulares.

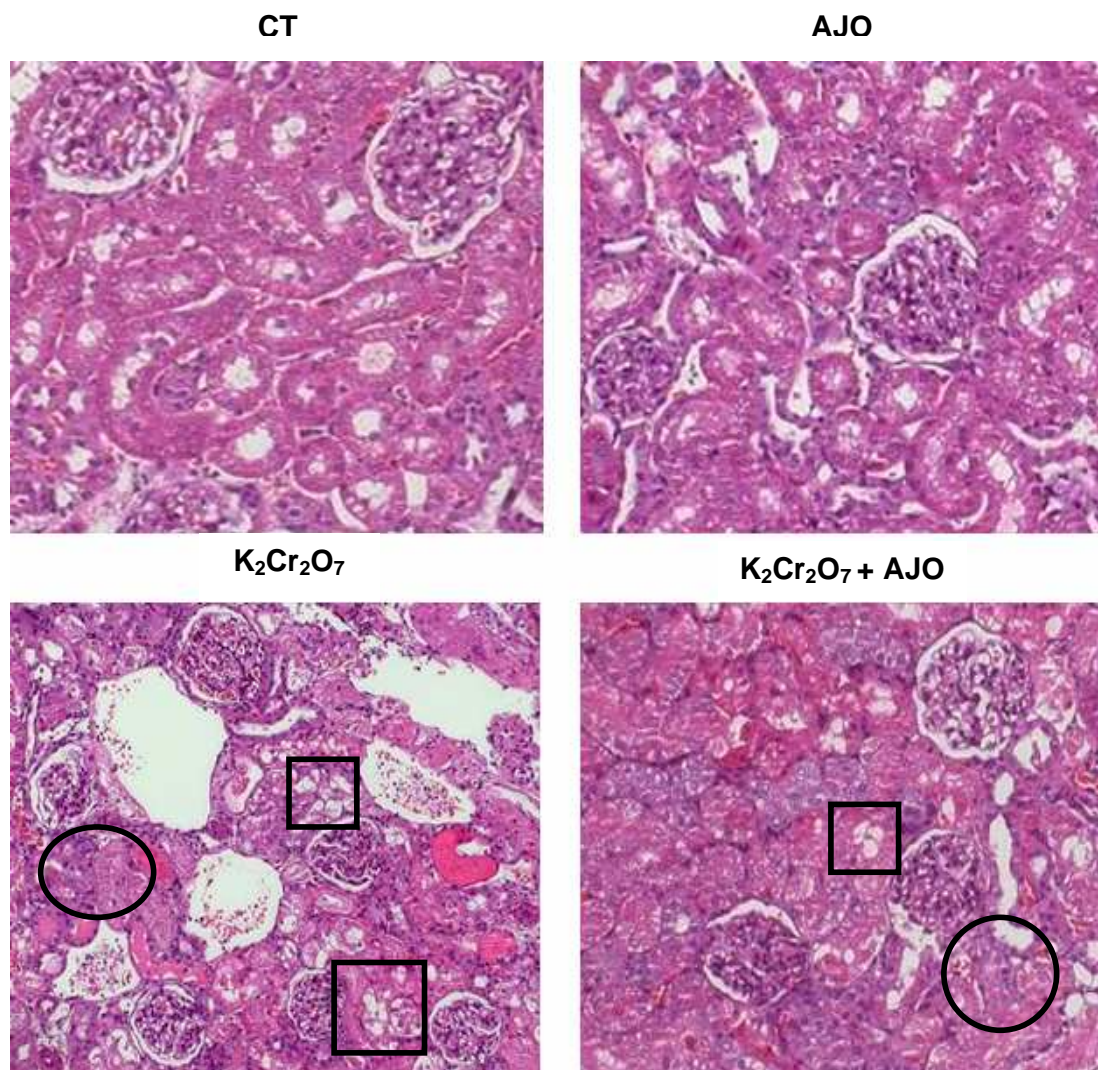


Figura 25. Imágenes representativas de áreas renales con la tinción de hematoxilina y eosina. Se observan (□) vacuolización y (o) necrosis en los túbulos proximales. 100X.

7.1.4. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA TUBULAR DAÑADA. El $K_2Cr_2O_7$ indujo un alto porcentaje de daño en túbulos proximales mientras que en el grupo con $K_2Cr_2O_7$ +AJO el daño tubular disminuyó un 40% (Tabla 13). La referencia son aquellos túbulos proximales normales en los que se consideran como 0% de daño.

Tabla 13. Porcentaje (%) del área tubular dañado	
K ₂ Cr ₂ O ₇	72.50±3.3
K ₂ Cr ₂ O ₇ +AJO	32.58±2.2

Datos son ± EE. p=0.0079. (n = 5).

7.1.5. EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO. Se encontró diferencia significativa en los niveles de malondialdehído y de proteínas oxidadas entre los grupos tratados con K₂Cr₂O₇ y el grupo CT. El K₂Cr₂O₇ incrementó 50% la concentración de malondialdehído (Figura 26A) y de proteínas oxidadas respecto al grupo CT (Figura 26B). En cambio el ajo previno este incremento.

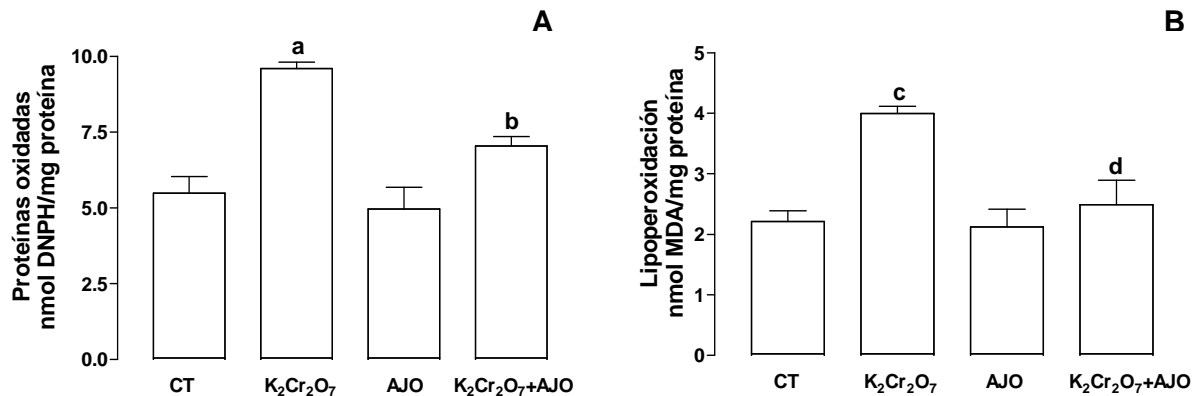


Figura 26. Efecto del K₂Cr₂O₇ y del ajo sobre el contenido renal de (A) proteínas oxidadas (n = 5) y (B) malondialdehído en ratas normales y con IRA (n = 5). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap<0.01 y ^cp<0.001 vs. CT, ^bp<0.01 y ^dp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇.

7.1.6. INMUNOHISTOQUÍMICA. La inmunohistoquímica de 3-NT (Figura 27A) y 4-HNE (Figura 27B), marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo respectivamente, mostró que las ratas del grupo CT y del grupo alimentado con ajo no hay señal para 3-NT y 4-HNE. En cambio en el grupo de K₂Cr₂O₇ sí hay señal para estas moléculas. En las ratas tratadas con K₂Cr₂O₇+AJO se observó una disminución de un 90% en la señal para 3-NT y 4-HNE (Tabla 14). Estos datos son consistentes con los resultados anteriores de estrés oxidativo en donde el ajo disminuyó la concentración de malondialdehído y de proteínas oxidadas en los grupos tratados con K₂Cr₂O₇.

Tabla 14. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica (% del área)				
	CT	AJO	K ₂ Cr ₂ O ₇	K ₂ Cr ₂ O ₇ +AJO
3-NT	9.02 ± 0.64	7.5 ± 0.77	16.88 ± 0.99 ^a	8.79 ± 0.97 ^b
4-HNE	5.45 ± 0.66	4.88 ± 0.61	11.79 ± 0.83 ^a	7.12 ± 0.52 ^b

Datos son ± EE. n = 5. ^ap<0.001 vs. CT y ^bp<0.0001 vs. K₂Cr₂O₇

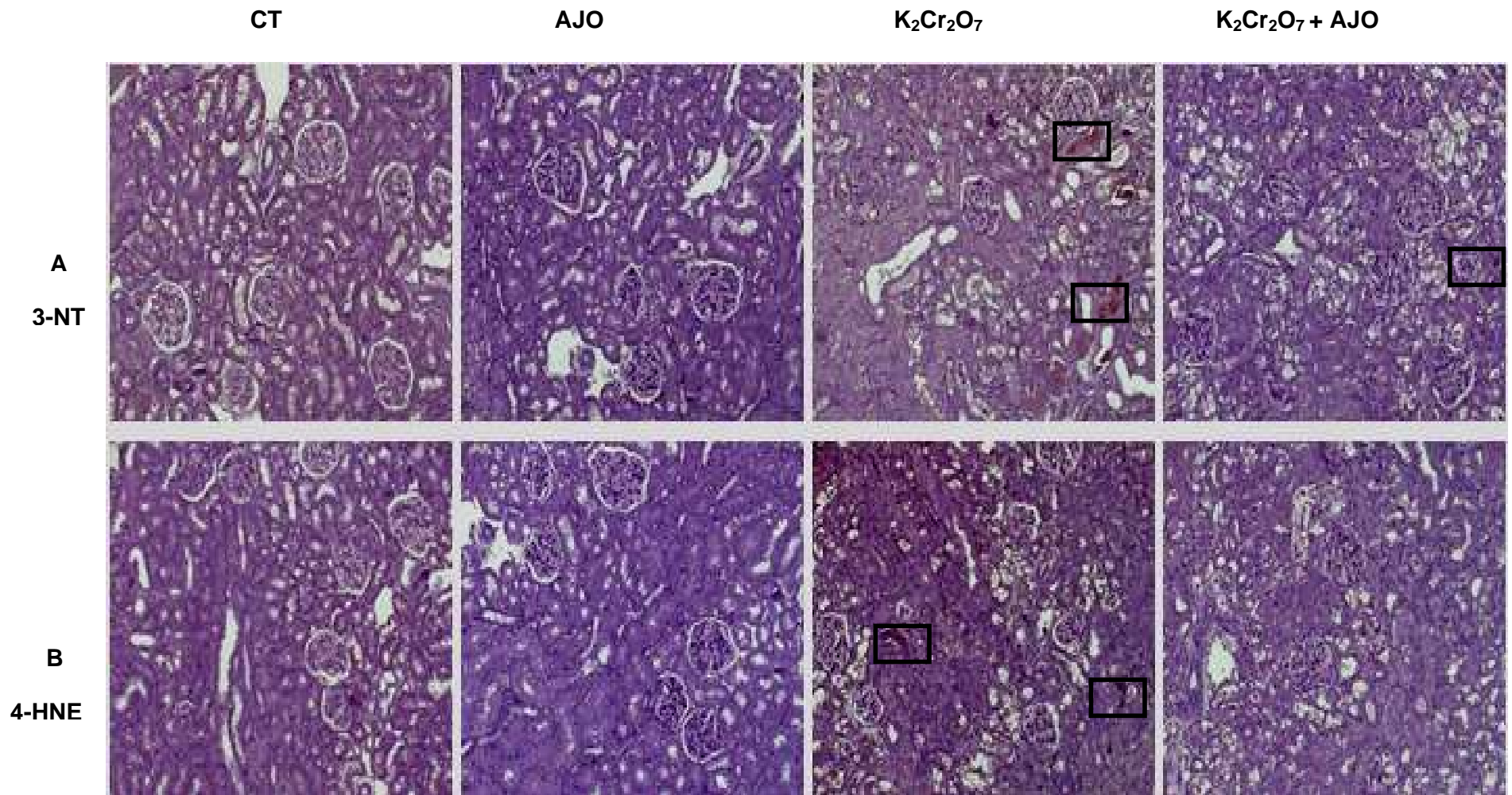


Figura 27. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE contrastada con hematoxilina en áreas renales. Se observa señal en las áreas señaladas con los cuadros. 100X.

7.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NDGA SOBRE LA IRA INDUCIDA CON $K_2Cr_2O_7$

7.2.1. PESO CORPORAL Y VOLUMEN URINARIO. El peso corporal de las ratas tratadas con DMSO y NDGA se modificó a lo largo del estudio con respecto al grupo CT. El tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ no tuvo ningún efecto en el peso corporal de las ratas (Figura 28). Por otro lado ninguno de los tratamientos tuvo efecto alguno sobre el volumen urinario (Figura 29).

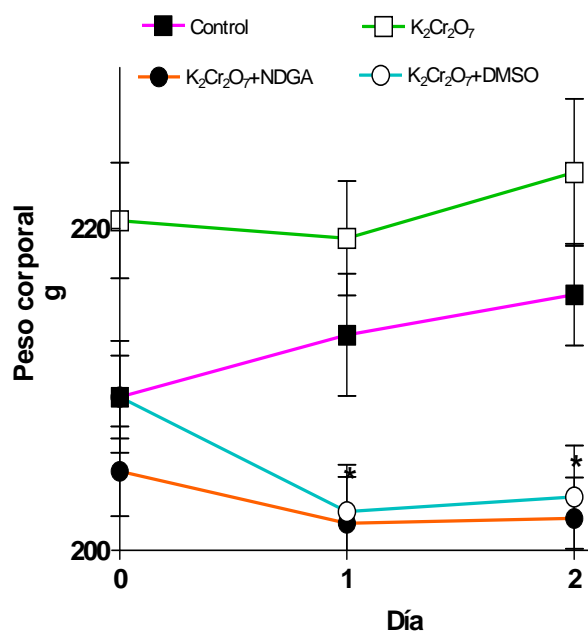


Figura 28. Efecto del $K_2Cr_2O_7$, NDGA y DMSO sobre el peso corporal de las ratas normales y con IRA. *p<0.01 vs control. (n = 11-14).

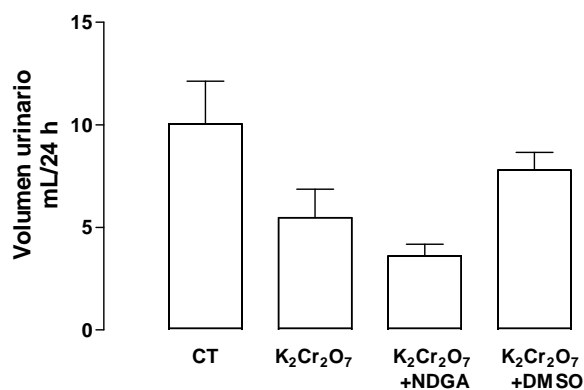


Figura 29. Efecto del $K_2Cr_2O_7$, NDGA y DMSO sobre el volumen urinario de ratas normales y con IRA. (n = 9-14).

7.2.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL. Se evaluó la concentración de creatinina y la actividad de GPx en suero, así como la proteinuria y la excreción urinaria de NAG.

El $K_2Cr_2O_7$ provocó disfunción renal significativa establecida por los marcadores evaluados: proteinuria (Figura 30A), aumento en la excreción urinaria de NAG (Figura 30B), incremento en la concentración de creatinina en suero (Figura 31A) y la disminución de la actividad de GPx en suero (Figura 31B).

La administración de NDGA previno parcialmente la disfunción inducida por el $K_2Cr_2O_7$. Este efecto se reflejó en la disminución del 58% de la proteinuria (Figura 30A), un 27% de la excreción urinaria de NAG (Figura 30B), un 58% de la concentración de creatinina en suero (Figura 31A) y un aumento del 34% de la actividad de GPx en suero en el grupo de $K_2Cr_2O_7$ +NDGA (Figura 31B).

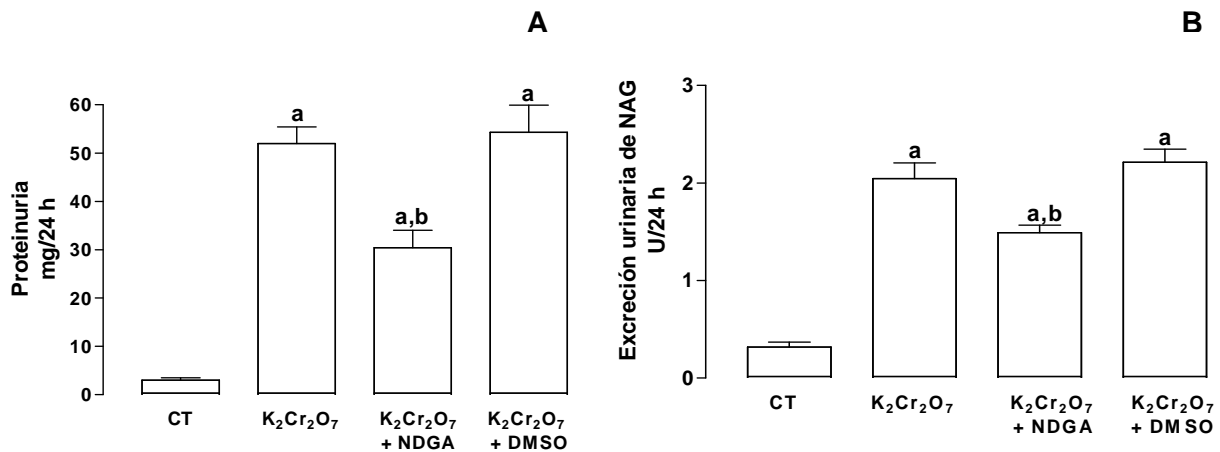


Figura 30. Efecto del K₂Cr₂O₇, NDGA y DMSO sobre la excreción urinaria de (A) proteínas totales (n = 8-11) y (B) N-acetil-β-D-glucosaminidasa en ratas normales y con IRA (n = 4-8). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap<0.001 vs. CT y ^bp<0.05 vs. K₂Cr₂O₇.

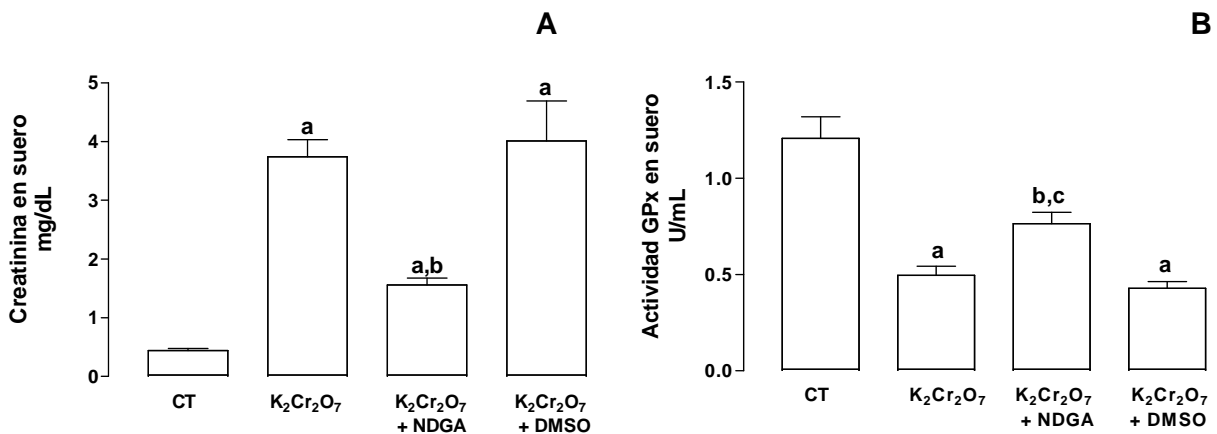


Figura 31. Efecto del K₂Cr₂O₇, NDGA y DMSO sobre la (A) concentración de creatinina en suero (n = 6-10) y (B) la actividad de GPx en suero en ratas normales y con IRA (n = 10-16). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap<0.001, ^cp<0.01 vs. CT y ^bp<0.001 vs. K₂Cr₂O₇.

7.2.3. HISTOLOGÍA. El análisis histológico del tejido renal se presenta en la Figura 32. Se observó una estructura normal en el grupo CT. En cambio las ratas tratadas con K₂Cr₂O₇ y K₂Cr₂O₇+DMSO presentaron un daño extenso y la mayor parte de los túbulos presentaron vacuolización y necrosis pero las ratas tratadas con K₂Cr₂O₇+NDGA presentaron un menor daño tubular con menos células epiteliales afectadas.

7.2.4. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA TUBULAR DAÑADA. El K₂Cr₂O₇ indujo daño en los túbulos proximales siendo prevenido en un 75% en el grupo de K₂Cr₂O₇+NDGA (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje (%) del área tubular dañado	
$K_2Cr_2O_7$	56.24±2.80
$K_2Cr_2O_7$ +NDGA	13.78±2.67 ^a
$K_2Cr_2O_7$ +DMSO	56.69±2.73

Datos son \pm EE. n = 5. ^ap<0.01 vs. $K_2Cr_2O_7$.

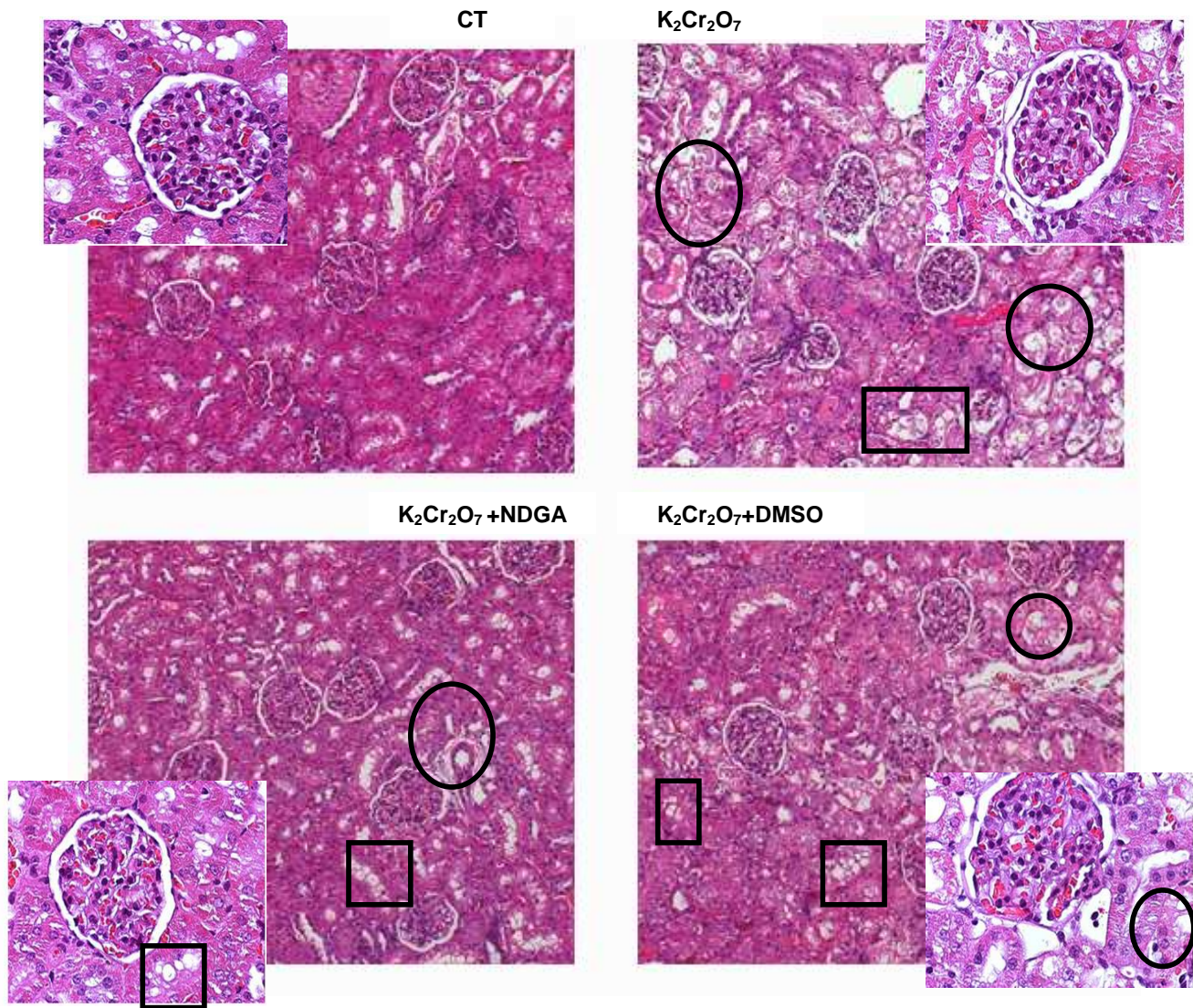


Figura 32. Imágenes representativas de áreas renales con la tinción de hematoxilina y eosina. Se observan (□) vacuolización y (o) necrosis en los túbulos proximales. 100X y 400X.

7.2.5. EVALUACION DEL DAÑO OXIDATIVO

7.2.6. INMUNOHISTOQUÍMICA. Como marcadores de estrés oxidativo se determinó 3-NT y 4-HNE. Las ratas del grupo CT fueron negativas para la inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE en cambio el grupo de $K_2Cr_2O_7$ y de $K_2Cr_2O_7$ +DMSO fueron positivas para la inmunohistoquímica de 3-NT (Figura 33A) y 4-HNE (Figura 33B). En las ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$ +NDGA se observó una disminución de un 80% de 3-NT y 4-HNE (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica (% del área)				
	CT	$K_2Cr_2O_7$	$K_2Cr_2O_7$ +NDGA	$K_2Cr_2O_7$ +DMSO
3-NT	3.54 ± 0.34	17.42 ± 0.79^a	3.04 ± 0.33^b	16.18 ± 0.97^a
4-HNE	0.88 ± 0.08	9.63 ± 0.39^a	1.29 ± 0.39^b	9.75 ± 0.94^a

Datos son \pm EE. n = 4. ^ap<0.001 vs. CT y ^bp<0.001 vs. $K_2Cr_2O_7$

7.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PJ34 SOBRE LA IRA INDUCIDA CON $K_2Cr_2O_7$

7.3.1. PESO CORPORAL Y VOLUMEN URINARIO. Ninguno de los tratamientos tuvo efecto alguno sobre el peso corporal de las ratas (Figura 34A) y sobre el volumen urinario (Figura 34B).

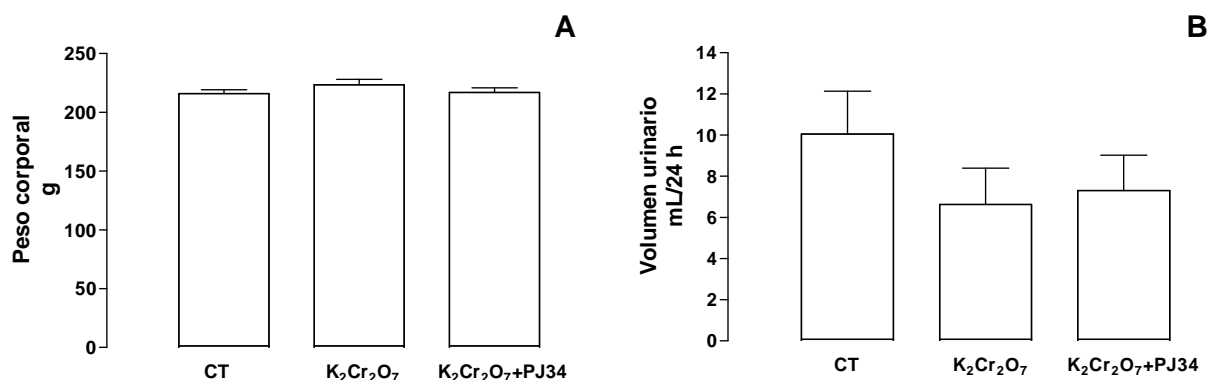


Figura 34. Efecto del $K_2Cr_2O_7$ y de PJ34 sobre (A) el peso corporal (n = 11-12) y (B) el volumen urinario (n = 10-11).

7.3.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL. Con respecto al grupo CT la administración de $K_2Cr_2O_7$ incrementó significativamente el BUN (Figura 35A) y la concentración de creatinina en suero (Figura 35B) así como la actividad de NAG en orina (Figura 36A) y disminuyó la actividad de GPx en suero (Figura 36B). El tratamiento con PJ34 previno parcialmente el daño funcional inducido por el $K_2Cr_2O_7$. Esto se corroboró al encontrar disminuciones de 16% en BUN (Figura 35A), de 33% en la concentración de creatinina en

suelo (Figura 35B) y de 36% en la excreción urinaria de NAG (Figura 36A). Además el tratamiento con PJ34 aumentó un 35% la actividad de GPx en suero (Figura 36B).

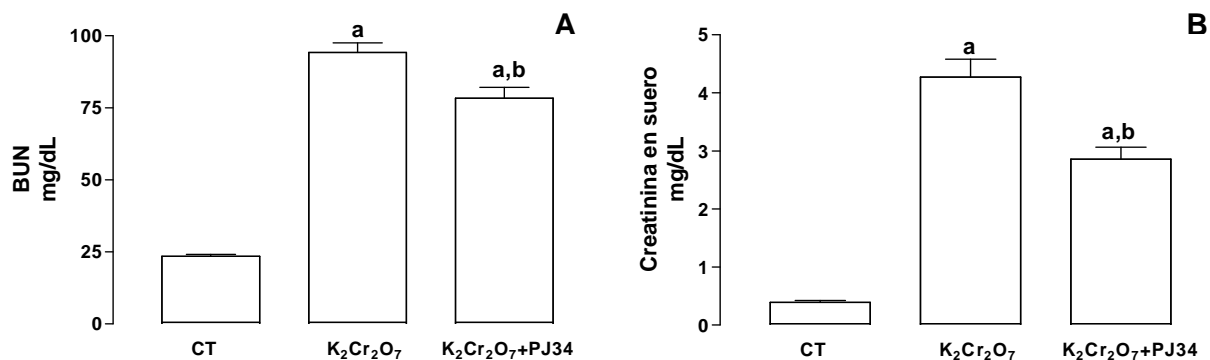


Figura 35. Efecto del K₂Cr₂O₇ y de PJ34 sobre (A) la concentración de nitrógeno de urea en sangre (BUN) (n = 10-11) y (B) la concentración de creatinina en suero (n = 9-12). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap < 0.001 vs. CT y ^bp < 0.01 vs. K₂Cr₂O₇

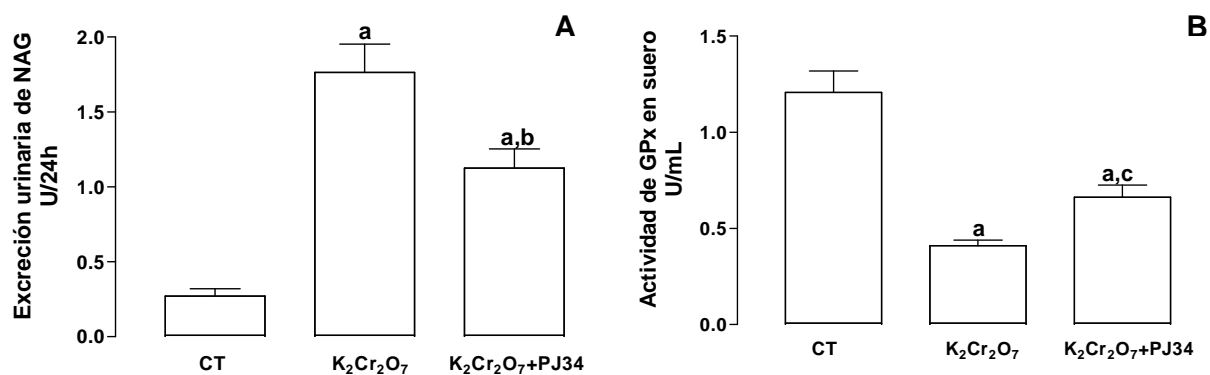


Figura 36. Efecto del K₂Cr₂O₇ y de PJ34 sobre (A) la excreción urinaria de NAG (n = 6-7) y (B) la actividad de GPx en suero (n = 10-12). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap < 0.001 vs. CT, ^bp < 0.01 y ^cp < 0.001 vs. K₂Cr₂O₇.

7.3.3. HISTOLOGIA. El análisis histológico del tejido renal se presenta en la Figura 37. Se observó una estructura normal en el grupo CT. En cambio las ratas tratadas con K₂Cr₂O₇ presentaron un daño extenso, la mayor parte de los túbulos presentaron vacuolas y necrosis. Las ratas tratadas con K₂Cr₂O₇+PJ34 presentaron un menor daño tubular con menos células epiteliales afectadas.

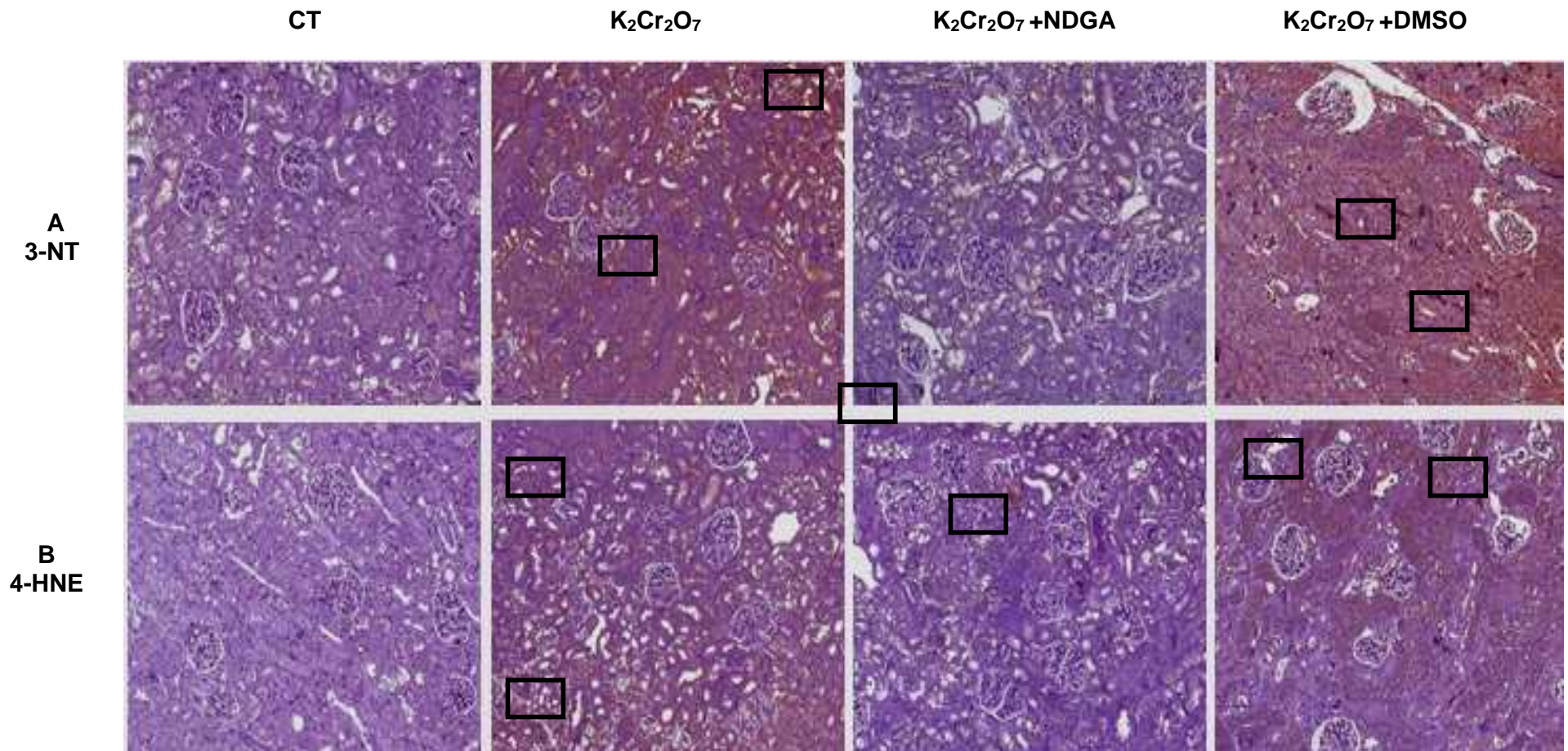


Figura 33. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE contrastada con hematoxilina en áreas renales. Se observa señal en las áreas señaladas con los cuadros. 100X.

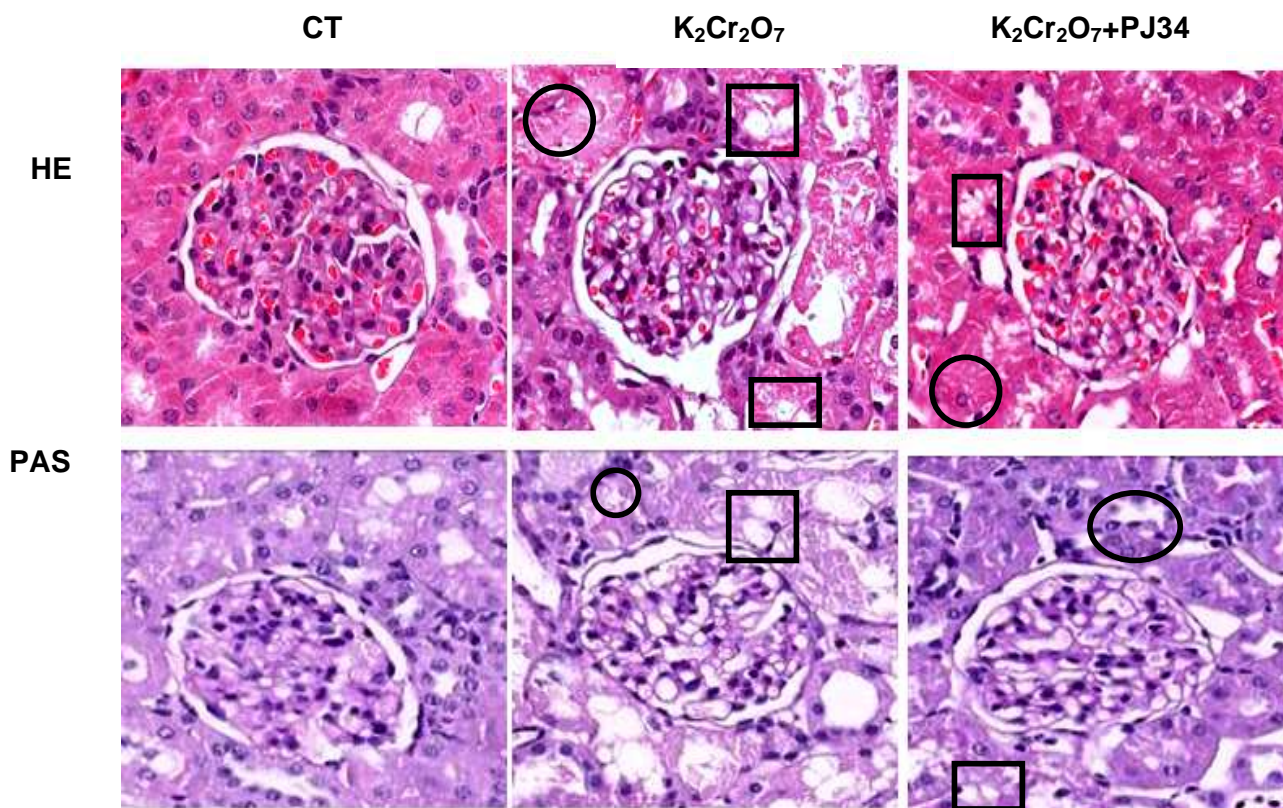


Figura 37. Imágenes representativas de áreas renales con la tinción de hematoxilina y eosina y PAS. Se observan (□) vacuolización y (○) necrosis en los túbulos proximales. 400X.

7.2.4. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA TUBULAR DAÑADA. El $K_2Cr_2O_7$ indujo un extenso daño en los túbulos proximales siendo prevenido en un 55% al administrar PJ34 (Tabla 17).

Tabla 17. Porcentaje (%) del área tubular dañado.	
$K_2Cr_2O_7$	22.43 ± 2.30
$K_2Cr_2O_7+PJ34$	9.98 ± 1.17^a

Datos son media \pm error estándar. ^a $p=0.0079$. (n = 5).

7.3.3. EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO. Se midió la concentración de malondialdehído y de proteínas oxidadas. La concentración de malondialdehído (Figura 38B) y de proteínas oxidadas en el grupo de $K_2Cr_2O_7$ (Figura 38A) aumentó 60% con respecto al grupo CT. La administración de PJ34 previno en un 37% la concentración de proteínas oxidadas y previno la producción de malondialdehído en el grupo $K_2Cr_2O_7+PJ34$ alcanzando valores iguales al control.

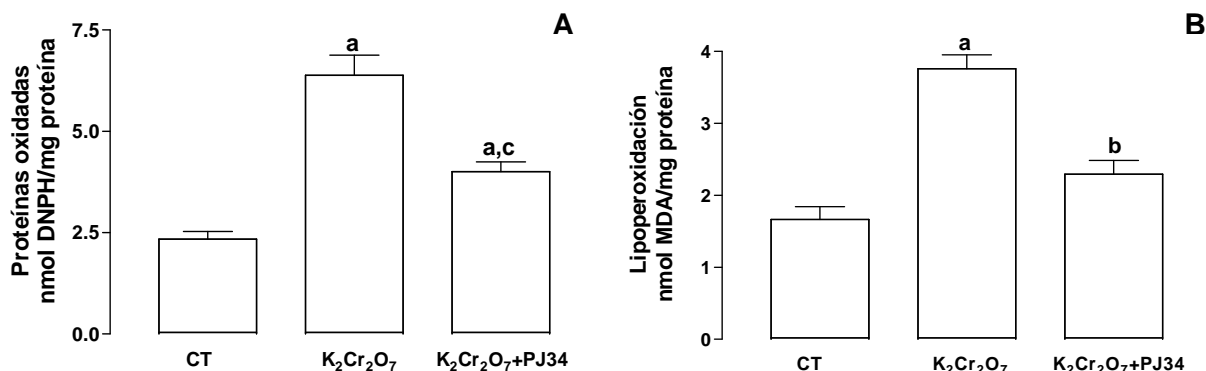


Figura 38. Efecto del K₂Cr₂O₇ y de PJ34 sobre el contenido renal de (A) proteínas oxidadas (n = 10-12) y (B) malondialdehído (n = 10-12). Los grupos marcados con letra distinta son significativamente diferentes. ^ap<0.001 vs. CT, ^bp<0.001 y ^cp<0.01 vs. K₂Cr₂O₇.

7.2.6. INMUNOHISTOQUÍMICA. Las ratas del grupo CT fueron negativas para la inmunohistoquímica de pADPR, 3-NT y 4-HNE en cambio el grupo de K₂Cr₂O₇ fueron positivas para la inmunohistoquímica de pADPR (Figura 39A), 3-NT (Figura 39B) y 4-HNE (Figura 39C). En las ratas tratadas con K₂Cr₂O₇+PJ34 se observó una disminución de un 80% de pADPR, 3-NT y 4-HNE (Tabla 18). Estos datos son consistentes con los resultados anteriores en donde el PJ34 disminuyó el estrés oxidativo. Por lo tanto el PJ34 disminuyó significativamente el daño oxidativo en riñón inducido por el K₂Cr₂O₇ (Tabla 18).

	CT	K ₂ Cr ₂ O ₇	K ₂ Cr ₂ O ₇ +PJ34
pADPR	0.98 ± 0.08	10.62 ± 1.04 ^a	2.10 ± 0.17 ^{c,b}
3-NT	0.15 ± 0.05	4.76 ± 0.50 ^a	1.02 ± 0.13 ^{c,b}
4-HNE	0.07 ± 0.05	3.56 ± 0.31 ^a	1.23 ± 0.20 ^{c,b}

Datos son ± desviación estándar. n = 4. ^ap<0.001, ^cp<0.01 vs. CT y ^bp<0.001 vs. K₂Cr₂O₇.

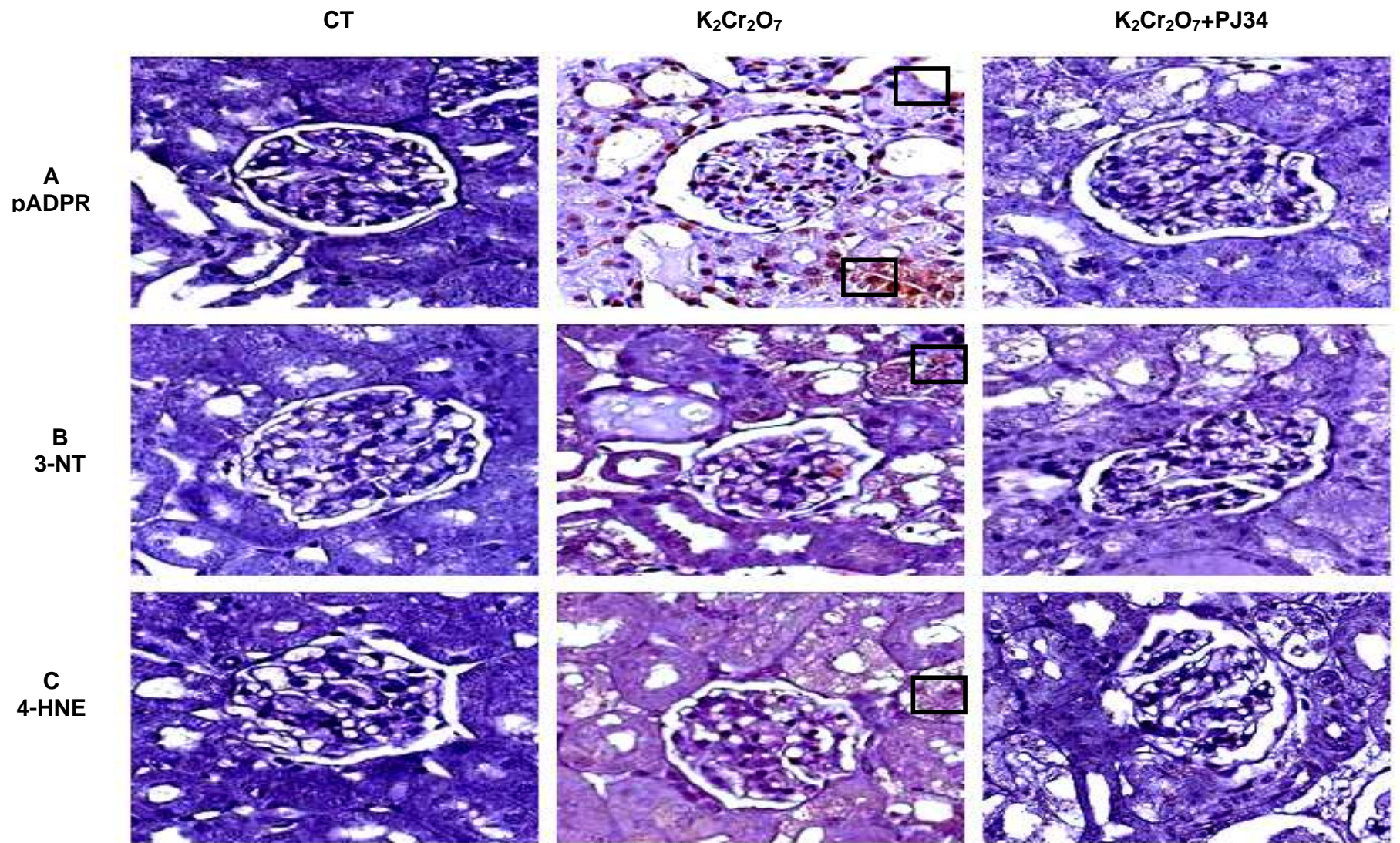


Figura 39. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de 3-NT y 4-HNE contrastada con hematoxilina. Se observa señal en las áreas señaladas con los cuadros. 400X.

8. DISCUSIÓN

8.1. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON UNA DIETA SUPLEMENTADA CON AJO EN POLVO AL 2% SOBRE LA IRA INDUCIDA POR $K_2Cr_2O_7$.

El $K_2Cr_2O_7$ es un compuesto que induce el daño renal funcionalmente y estructuralmente a las 48 horas de tratamiento. La IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ no provoca en las ratas la disminución en el consumo de agua, pero sí disminuye su apetito. Por esta razón las ratas se mantienen en su peso inicial y no aumentan de peso con el tiempo como ocurre normalmente (Barrera et al., 2003b). Esto corrobora lo obtenido en este trabajo que en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ no hubo disminución del peso corporal de las ratas. Por otro lado Arreola-Mendoza et al., (2006) reporta que la administración de $K_2Cr_2O_7$ disminuye el volumen urinario en el día 2. Se observó en el día 2 después de la administración de $K_2Cr_2O_7$ disminución del volumen urinario pero no es estadísticamente diferente al control. Esta alteración en la reabsorción renal de agua y en la osmolaridad del flujo urinario, es consecuencia del daño al túbulo proximal producido por $K_2Cr_2O_7$ cabe mencionar que no es el único segmento tubular en el que se reabsorbe ya que en el asa de Henle y en el túbulo distal también hay reabsorción de agua en menor proporción.

El $K_2Cr_2O_7$ se acumula a nivel tubular y causa necrosis en una extensa zona de los túbulos proximales, lo que causa que el contenido de las células se excreten con el consecuente aumento en la actividad de enzimas que se sintetizan en las células de los túbulos como: a) NAG una enzima lisosómica que es responsable del fraccionamiento de macromoléculas como glucoproteínas, glucolípidos y glucosaminoglicanos (Patel et al., 1975; Wellwood et al., 1976), b) GST una enzima que conjuga al GSH con productos de la lipoperoxidación como el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal para convertirlos en sustancias menos tóxicas, solubles en agua y por tanto más fácilmente excretables (Lo Bello et al., 2001) y c) GPx una enzima extracelular que se encarga de oxidar GSH (Lawrence y Burk, 1976). Por esto en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ hay un aumento en la actividad urinaria de NAG y GST y una disminución en la actividad de GPx en suero lo que concuerda con lo reportado en Pedraza-Chaverrí et al., (2005). Por otro lado el $K_2Cr_2O_7$ forma un conjugado con el GSH lo que explica la disminución de la actividad de GPx y GST. Lo anterior coincide con las extensas zonas de necrosis y el alto % de daño tubular observado en la histología. También se excretan en la orina otras proteínas que son detectadas mediante un método turbidimétrico. El aumento en la excreción urinaria de proteína refleja daño glomerular o tubular. El aumento inducido por el $K_2Cr_2O_7$ se debe, principalmente, a que como consecuencia del daño estructural, se altera la capacidad tubular de reabsorción de proteínas de bajo peso molecular y se excretan aumentando su concentración en la orina

(Pedraza-Chaverrí et al., 1995a). De la misma forma debido al daño tubular, a la obstrucción de los túbulos por fragmentos de los epitelios dañados y desprendidos a la luz tubular y a la alteración de la capacidad tubular de reabsorción y secreción, se altera la excreción de productos finales del metabolismo como son: a) la creatinina un producto terminal del metabolismo de la creatina que se deriva de la fosfocreatina, el principal reservorio de energía en el músculo y es filtrada completamente por los riñones (Schor et al., 1981) y b) la urea que es el producto final del metabolismo de los aminoácidos y se elimina finalmente por la orina. Ambos aumentaron su concentración en suero en las ratas tratadas con $K_2Cr_2O_7$.

El mecanismo por el cual el $K_2Cr_2O_7$ induce IRA aún no está completamente descrito, sin embargo, la generación de ERO como OH^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 está ampliamente descrita (Liu y Shi, 2001; Pourahmad y O'Brien, 2001; Liu et al., 1999b). El OH^\bullet sustrae un hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de la membrana celular y da inicio al proceso de lipoperoxidación donde se da lugar a la formación de un nuevo radical orgánico. Seguidamente este radical orgánico ataca el lípido vecino y da lugar a un nuevo radical y así sucesivamente para crear una reacción en cadena que rompe los gradientes iónicos transmembranales dañando de manera irreversible a la membrana celular. Como productos finales de la lipoperoxidación se encuentra el malondialdehído y el 4-hidroxi-nonenal (Lefevre et al., 1998). En este trabajo ambos parámetros se encontraron aumentados. Además el OH^\bullet puede oxidar los grupos carboxilo de las proteínas y aumentar los grupos carbonilo en las proteínas, lo que coincide con el aumento encontrado en este trabajo, provocando un daño grave que resulta en la fragmentación de las cadenas polipeptídicas, el aumento de la susceptibilidad de sufrir proteólisis, con lo que perdería su función o disminuiría esta susceptibilidad incrementándose el número de proteínas no funcionales en la célula (Zitnanova et al., 2006; Kocic et al., 1998). Por otro lado se encontró un aumento de la nitración de proteínas que se debe a la alta producción de $ONOO^-$ una ERN implicada en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$. El efecto sobre estos marcadores de estrés oxidativo coinciden con Barrera et al., (2003b) quién reportó el aumento de la lipoperoxidación, la nitración de proteínas y el contenido de grupos carbonilo en las proteínas en riñón en las 48 horas de haber administrado $K_2Cr_2O_7$.

El ajo es utilizado como condimento en las comidas y en la medicina tradicional. Algunos de los efectos benéficos que se le han atribuido al ajo son como hipolipidémico y antioxidante (Maldonado et al., 2003a). El tratamiento con ajo aminora el daño en riñón (Pedraza-

Chaverrí et al., 1999; Iqbal y Athar, 1998), corazón (Rietz et al., 1993) y cerebro (Numagami et al., 1996) mediado por EROS. Se ha reportado que una alimentación con una dieta suplementada con ajo en polvo al 2% por 14 días previene el estrés oxidativo y la nefrotoxicidad inducida por gentamicina, este efecto de protección del ajo se relaciona con la prevención de: a) la disminución de la actividad de Mn-SOD y GPx, b) el aumento de la lipoperoxidación, c) el daño tubular, d) el incremento de BUN y la excreción urinaria de NAG y e) la disminución de la depuración de creatinina (Pedraza-Chaverrí et al., 2000a). Lo que coincide con lo encontrado en éste trabajo en donde la alimentación con una dieta suplementada con ajo en polvo al 2% por 33 días previno parcialmente en un 34% el incremento de BUN, en un 41.3% el incremento de creatinina, en un 57% el incremento de la proteinuria, en un 53% el incremento de la excreción urinaria de NAG, en un 50% la disminución de la actividad de GPx y una prevención del incremento de GST en orina lo que coincide con la prevención parcial en un 40% del daño tubular inducido por $K_2Cr_2O_7$. Por otro lado el extracto acuoso del ajo en polvo atrapa OH^\bullet , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 (Pedraza-Chaverrí et al., 2006) y $ONOO^-$ (Pedraza-Chaverrí et al., 2007). Lo anterior explica la prevención del aumento de estrés oxidativo observado en la IRA inducido por $K_2Cr_2O_7$. Sin embargo, el ajo es rico en compuestos organosulfurados como son: S-alilcisteína sulfóxido (alina) que se encuentra de 10-17 mg/g producto, γ -glutamylcisteínas 12-35 mg/g producto y compuestos derivados de la alina 4-11 mg/g producto (Lawson, 1998). La alina, el compuesto más abundante del ajo, aminora el daño cardiaco inducido por isoproterenol además disminuye la lipoperoxidación, aumenta la actividad de la GR y de la GST, e incrementa los niveles de GSH (Sangeetha y Quine, 2006). También se ha visto que incrementa los niveles de GSH y disminuye la lipoperoxidación en corazón, riñón e hígado. La alina incrementa la actividad de la SOD y de la catalasa en hígado en un modelo de diabetes inducida por aloxano (Augusti y Sheela, 1996). Un tratamiento vía oral de alicina previene la hepatitis inducida por D-galactosamina, incrementa la actividad SOD, catalasa, GPX y GST incrementa los niveles de GSH y disminuye la lipoperoxidación en hígado (Vimal y Devaki, 2004). La alina atrapa OH^\bullet (Kourounakis y Rekká, 1991), $O_2^{\bullet-}$ (Chung, 2006), H_2O_2 e inhibe la lipoperoxidación (Ide et al., 1996). Por lo tanto se sugiere que la alina puede ser responsable del efecto antioxidante del ajo en polvo y que puede ser responsable del efecto benéfico observado en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$, sin embargo falta demostrarlo experimentalmente.

8.2. EFECTO DEL NDGA SOBRE LA IRA INDUCIDA POR $K_2Cr_2O_7$

El $K_2Cr_2O_7$ indujo IRA y estrés oxidativo en las ratas (Pedraza-Chaverrí et al., 2005; Barrera et al., 2003b; Fatima et al., 2005). La administración del NDGA no tuvo efecto sobre el volumen urinario pero si disminuyó el peso corporal de las ratas como se encuentra reportado en Lambert et al., (2002) quien estudió los efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos al administrar NDGA en varias dosis, por otro lado, el $K_2Cr_2O_7$ no tuvo efecto sobre el peso corporal y el volumen urinario (Arreola-Mendoza et al., 2006).

El NDGA posee excelentes propiedades antioxidantes y previene la formación de ERO. Anjaneyulu y Chopra, 2004 administraron NDGA por 4 semanas en ratas con nefropatía diabética y reportan una disminución del peso corporal de las ratas, prevención del estrés oxidativo lo que se reflejó en: a) la disminución de la lipoperoxidación, b) el aumento de los niveles de GSH, c) el aumento de la actividad de SOD y d) el aumento de la actividad de la catalasa. Además el NDGA previno el daño renal reduciendo la proteinuria y la poliuria y baja los niveles de glucosa. Por otro lado Ansar et al., 1999 encontró que el NDGA previene el daño renal y hepático inducido por Fe-NTA en ratones. De igual forma en este estudio el NDGA previno parcialmente en un 58% el incremento de creatinina, en un 58% el incremento de proteinuria, en un 27% la excreción urinaria de NAG y en un 34% la disminución de la actividad de GPx inducido por la administración de $K_2Cr_2O_7$ lo que es consistente con lo observado en el análisis histológico en donde el NDGA previno en un 75% el daño tubular.

El NDGA es capaz de atrapar $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , $ONOO^-$ (Floriano-Sánchez et al., 2006) lo que es consistente con la prevención del estrés oxidativo lo que se reflejó en la prevención del aumento de la lipoperoxidación y de la nitración de proteínas.

Por otro lado el DMSO es una molécula anfipática que se utiliza como un solvente muy eficiente para compuestos que son insolubles en agua, posee actividad antiinflamatoria y otros efectos benéficos (Tabla 19) en: en el edema cerebral, en la esquizofrenia, en desordenes dermatológicos, en la cirrosis hepática, en desórdenes gastrointestinales, entre otras (Santos et al., 2003). Debido a que en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ se genera OH^{\cdot} (Shi y Dalal, 1989), el DMSO podría tener un efecto benéfico sobre la IRA inducida por el $K_2Cr_2O_7$ debido a la capacidad del DMSO de atrapar OH^{\cdot} . Los resultados obtenidos reflejan que el DMSO no tuvo ningún efecto sobre el daño renal inducido por $K_2Cr_2O_7$ lo que coincide con lo reportado en Francés cato et al., (2007) donde el DMSO que se utilizó como vehículo de la parten olida no tuvo efecto sobre el daño renal inducido por cisplatino. Sin embargo Florián-Sánchez et al., (2005) menciona que el NDGA es un mejor atracador del

radical OH[•] que el DMSO, lo que se refleja en la capacidad para atrapar el 50% del radical OH[•] *in Vitro* es menor para el NDGA (0.15± 0.02 µM) que para el DMSO (174±16 µM) (Florián-Sánchez et al., 2005). Cabe mencionar que además la dosis que se utilizó de DMSO es menor (30 mg/kg s.c.) a la reportada en los modelos donde se observó una protección (100-4000 mg/kg) (Tabla 19).

Tabla 19. Modelos en ratas en donde el DMSO tuvo un efecto benéfico.		
MODELO	DOSIS DE DMSO	REFERENCIA
Isquemia reperfusión hepático	500 mg/kg vi. (intravenoso) 10 minutos antes de la isquemia.	Chiapa et al., 2003
Cirrosis hepática inducida por tío acetamida	4 g/kg tres veces/semana por 12 semanas p.o. (oral)	Bruck et al., 2001
Isquemia-reperfusión en hígado.	500 mg/kg i.v. 3 veces al día por una semana.	Sahin et al., 2004
Nefropatía en ratas inducida por gentamicina.	0.1 g/kg/día i.p. de una solución de DMSO al 50% por 10 días.	Ali y Mousa, 2001

8.3. EFECTO DEL PJ34 SOBRE LA IRA INDUCIDA POR K₂Cr₂O₇

De la misma forma el K₂Cr₂O₇ indujo IRA y estrés oxidativo en las ratas (Pedraza-Chaverri et al., 2005; Barrera et al., 2003b; Fatima et al., 2005), también el K₂Cr₂O₇ ni el PJ34 tuvieron efecto en el peso corporal de las ratas ni en el volumen urinario.

El PJ34 no es un antioxidante, sin embargo debido a su capacidad de inhibir selectivamente a la PARP se ha estudiado en varios modelos. Mabley et al., (2004) encontró que el PJ34 reduce la poliposis intestinal (inflamación) y el estrés oxidativo en ratones (reducción de los niveles de lipoperoxidación en intestino). Liaudet et al., (2002) demostró que la inhibición de la PARP por el PJ34 reduce la producción de NO[•] y lipoperoxidación en los pulmones durante una inflamación aguda del pulmón inducida por un lipopolisacárido. Stone et al., (2005) concluyó en su trabajo que el PJ34 ayuda a mantener el buen funcionamiento de la mitocondria renal y disminuye algunos marcadores de daño renal como el NGAL (neutrófilo gelatinasa asociada a lipocalina) en la isquemia-reperfusión de la arteria torácica. En ninguno de estos estudios se menciona que la administración del PJ34 haya tenido algún efecto sobre todos los parámetros evaluados.

Esto sustenta el efecto del tratamiento con PJ34 encontrado: la prevención parcial del incremento de BUN en un 16%, de creatinina en un 33%, la excreción urinaria de NAG en un 36%, lo que coincide con lo observado en la histología en donde previno parcialmente en un 55% el daño tubular inducido por $K_2Cr_2O_7$. Por lo tanto la expresión de la PARP en los túbulos y en los glomérulos se asocia al daño renal (Obrosova y Julius, 2005) en este caso el inducido por el $K_2Cr_2O_7$. De igual manera el PJ34 previno el aumento de malondialdehído, previno en un 80% el aumento de 4-HNE y de 3-NT y previno parcialmente en un 37% el aumento del contenido de grupos carbonilos en proteínas en riñón, es decir previno en parte el estrés oxidativo.

Debido a la sobreactivación de la PARP, que se observó en la inmunohistoquímica en el grupo tratado con $K_2Cr_2O_7$, esto lleva a la célula a un consumo excesivo de NAD^+ , ésta molécula es el principal aceptor de electrones en la oxidación de las moléculas combustibles durante la glicólisis (conversión de la glucosa a piruvato con la formación de ATP), la disminución de la concentración de NAD^+ produce disminución de la glicólisis y como consecuencia disminución de ATP afectando el transporte de Ca^{2+} que se lleva a cabo por medio de la ATPasa de Ca^{2+} localizada en el retículo sarcoplásmico, un compartimiento especializado en el almacenamiento de Ca^{2+} . Un incremento de Ca^{2+} citosólico, proviniendo del medio extracelular o de depósitos intracelular, puede conducir a la muerte celular por activación de enzimas (endonucleasas, proteasas y fosfatasas). Por otro lado el $NADP^+$ es un derivado del NAD^+ , ambos son metabolitos del ATP, el grupo fosforilo procedente del ATP está catalizada por la NAD^+ cinasa. El $NADP^+$ por acción de la isocitrato deshidrogenasa o la enzima málica se transfiere un ión hidruro para generar NADPH. El NADPH es sustrato de la glutatión reductasa, enzima responsable de regenerar el GSH. Por lo tanto la disminución de NAD^+ se relaciona con la disminución de GSH haciendo más susceptible a la célula al daño oxidativo. Y como consecuencia activar señales de apoptosis celular, por esto es necesario, inhibir esta enzima y así no llevar a la célula a la muerte, en este estudio se encontró que la administración de PJ34 inhibe en un 80% la activación de la PARP.

A pesar de todos los efectos benéficos obtenidos por el uso del ajo en polvo, el NDGA y el PJ34, se considera que la protección no es total porque no se previenen otros tipos de alteraciones, lo cual sugiere que el estrés oxidativo no es el único mecanismo implicado en la nefrotoxicidad ya que se han utilizado inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II para aminorar el daño renal inducido por $K_2Cr_2O_7$ (Pedraza-Chaverrí et al.,

1995b) y se ha estudiado el papel de la hormona tiroides en la IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ (Rodríguez et al., 2003).

Es importante señalar que el efecto obtenido sobre el daño funcional inducido por $K_2Cr_2O_7$ es prevenido parcialmente con un 48% con la dieta suplementada con ajo en polvo al 2%, un 44% con el NDGA y un 30% con el PJ34; el daño tubular inducido por $K_2Cr_2O_7$ es prevenido parcialmente con un 40% con la dieta suplementada con ajo en polvo al 2%, un 75% con el NDGA y un 56% con el PJ34; el estrés oxidativo es prevenido con la dieta suplementada con ajo en polvo al 2% y el NDGA pero con el PJ34 es prevenido parcialmente con un 95%. Por lo tanto la dieta suplementada con ajo en polvo al 2% es el mejor tratamiento para prevenir el daño funcional y el estrés oxidativo inducido por $K_2Cr_2O_7$ y el NDGA es el adecuado para mejorar el daño tubular y el estrés oxidativo inducido por $K_2Cr_2O_7$.

9. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el ajo en polvo, el NDGA y el PJ34 son capaces de prevenir parcialmente el daño renal funcional y estructural causado por la administración de $K_2Cr_2O_7$. Este efecto puede ser consecuencia de que el ajo en polvo y el NDGA tienen propiedades antioxidantes que disminuyen el estrés oxidativo relacionado con el daño renal inducido por el $K_2Cr_2O_7$. Por otra parte, el PJ34 previene parcialmente la IRA asociada a la administración de $K_2Cr_2O_7$. El efecto benéfico del PJ34 puede deberse, al menos en parte, a su capacidad para inhibir a la PARP, enzima que está contribuyendo al daño renal inducido por $K_2Cr_2O_7$.

10. REFERENCIAS

- Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabó C, Endres M. 2001. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med* 7:255-260.
- Ader F, Le Berre R, Lancel S, Faure K, Viget NB, Nowak E, Neviere R, Guery BP. 2007. Inhaled nitric oxide increases endothelial permeability in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Intensive Care Med* 33:503-510.
- Agostinelli E, Vedova LD, Belli F, Condello M, Arancia G, Seiler N. 2006. Sensitization of human colon adenocarcinoma cells (LoVo) to reactive oxygen species by a lysosomotropic compound. *Int J Oncol* 29:947-955.
- Aguilar A, Alvarez-Vijande R, Capdevila S, Alcoberro J, Alcaraz A. 2007. Antioxidant patterns (superoxide dismutase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase) in kidneys from non-heart-beating-donors: experimental study. *Transplant Proc* 39:249-252.
- Aktan S, Aykut C, Yegen BC, Okar I, Ozkutlu U, Ercan S. 1993. The effect of nordihydroguaiaretic acid on leukotriene C4 and prostaglandin E2 production following different reperfusion periods in rat brain after forebrain ischemia correlated with morphological changes. *Fatty Acids* 49:633-641.
- Ali BH, Mousa HM. Effect of dimethyl sulfoxide on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2001 Apr;20(4):199-203.
- Alvarez-Gonzalez R, Spring H, Muller M, Burkle A. 1999. Selective loss of poly(ADP-ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylation-induced apoptosis of HeLa cells. *J Biol Chem* 274:32122-32126.
- Anand SS. 2005. Protective effect of vitamin B6 in chromium-induced oxidative stress in liver. *J Appl Toxicol* 25:440-443.
- Anderson, S.C. y Cockayne, S. *Química Clínica*. Mc Graw Hill Interamericana. México, 1995. pp 380-420.
- Andreu GL, Delgado R, Velho JA, Curti C, Vercesi AE. 2005. Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Arch Biochem Biophys* 439:184-193.
- Anjaneyulu M, Chopra K. 2004. Nordihydroguaiaretic acid, a lignin, prevents oxidative stress and the development of diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology* 72:42-50
- Ansar S, Iqbal M, Athar M. 1999. Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrosyltriacetate-mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice. *Carcinogenesis* 20:599-606.
- Appel J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. 1991. Reaction of chromium (VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium (VI)-induced DNA damage. *Environ Health Perspect* 92:53-62.
- Appenroth D, Karge E, Kiessling G, Wechter WJ, Winnefeld K, Fleck C. 2001. LLU-alpha, an endogenous metabolite of gamma-tocopherol, is more effective against metal nephrotoxicity in rats than gamma-tocopherol. *Toxicol Lett* 122:255-265.
- Appenroth D, Winnefeld K. 1998. Vitamin E and C in the prevention of metal nephrotoxicity in developing rats. *Exp Toxicol Pathol* 50:391-396.
- Arreola-Mendoza L, Reyes JL, Melendez E, Martin D, Namorado MC, Sanchez E, Del Razo LM. 2006. Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology* 218:237-246.
- Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cardenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol* 98:231-239.
- Augusti KT, Sheela CG. 1996. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* 52:115-120.
- Babior BM. 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 298:659-668.
- Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. 2005. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci* 76:2125-2135.
- Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ. 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radic Biol Med* 22:471-478.

- Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K. 1992. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* 267:1569-1575.
- Banasik M, Ueda K. 1994. Inhibitors and activators of ADP-ribosylation reactions. *Mol Cell Biochem* 138:185-197.
- Barceloux DG. 1999. Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol* 37:173-194.
- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003a. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K₂Cr₂O₇. *Free Radic Biol Med* 34:1390-1398.
- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003b. Protective effect of SnCl₂ on K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity in rats: the indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzymes. *Life Sci* 73:3027-3041.
- Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426.
- Batirel HF, Naka Y, Kayano K, Okada K, Vural K, Pinsky DJ, Oz MC. 2002. Intravenous allicin improves pulmonary blood flow after ischemia-reperfusion injury in rats. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 43:175-179.
- Bickers DR, Athar M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 126:2565-2575.
- Blasiak J, Kowalik J. 2000. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat Res* 469:135-145.
- Block E. 1996. The chemistry and health benefits of organosulfur and organoselenium compounds in garlic (*Allium sativum*): Recent findings, En: *Hypernutritious foods*, JW Finley, DJ Armstrong, S Nagy, SF Robinson, Eds., AgSci Inc, Auburnvale, FL. pp 261-292.
- Bosgelmez II, Guvendik G. 2004. Effects of taurine on oxidative stress parameters and chromium levels altered by acute hexavalent chromium exposure in mice kidney tissue. *Biol Trace Elem Res* 102:209-225.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718.
- Breen AP, Murphy JA. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18:1033-1077.
- Browne SE, Beal MF. 2006. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* 8:2061-2073.
- Bruck R, Shirin H, Aeed H, Matas Z, Hochman A, Pines M, Avni Y. 2001. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. *J Hepatol* 35:457-464.
- Burkle A. 2005. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS J* 272:4576-4589.
- Burkle A. 2006. DNA repair and PARP in aging. *Free Radic Res* 40:1295-1302.
- Buschfort C, Muller MR, Seeber S, Rajewsky MF, Thomale J. 1997. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res* 57:651-658.
- Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ. 1992. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 185:960-966.
- Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.
- Cemek M, Caksen H, Bayiroglu F, Cemek F, Dede S. 2006. Oxidative stress and enzymic-non-enzymic antioxidant responses in children with acute pneumonia. *Cell Biochem Funct* 24:269-273.
- Chapman LM, Roling JA, Bingham LK, Herald MR, Baldwin WS. 2004. Construction of a subtractive library from hexavalent chromium treated winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) reveals alterations in non-selenium glutathione peroxidases. *Aquat Toxicol* 67:181-194.
- Cheeseman KH, Slater TF. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49:481-493.
- Cheng JS, Jan CR. 2002. Effect of nordihydroguaiaretic acid on intracellular Ca²⁺ concentrations in hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 16:485-490.
- Chiappa A, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Bellomi M, Biffi R, Bertani E, Vezzoni A, Crosta C, Andreoni B. 2003. Effects of the free radical scavenger dimethyl sulphoxide on experimental normothermic ischaemia of the liver. *Dig Surg* 20:238-245.
- Chinn EK, Batsakis JG, Pilon H, Delbecq K. 1978. Serum creatinine. A CAP survey. *Am J Clin Pathol.* 70(3 Suppl):503-507.

- Chiou SS, Chang TT, Tsai SP, Jang RC, Lin SK, Lee SC, Tsai SM, Tsai LY. 2006. Lipid peroxidation and antioxidative status in beta-thalassemia major patients with or without hepatitis C virus infection. *Clin Chem Lab Med* 44:1226-1233.
- Chirino YI, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 4:1-20.
- Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. 2006. Role of peroxynitrite anion in different diseases. *Rev Invest Clin* 58:350-358.
- Chundawat RS, Sood PP. 2005. Vitamins deficiency in developing chick during chromium intoxication and protection thereof. *Toxicology* 211:124-131.
- Chung LY. 2006. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *J Med Food* 9:205-213.
- Conrad MF, Albadawi H, Stone DH, Crawford RS, Entabi F, Watkins MR. 2006. Local administration of the Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) inhibitor, PJ34 during hindlimb ischemia modulates skeletal muscle reperfusion injury. *J Surg Res* 135:233-237.
- Czapski G, Goldstein S. 1995. The role of the reactions of .NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach. *Free Radic Biol Med* 19:785-794.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342:249-268.
- Dantzer F, Ame JC, Schreiber V, Nakamura J, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol* 409:493-510.
- Dartsch PC, Hildenbrand S, Kimmel R, Schmahl FW. 1998. Investigations on the nephrotoxicity and hepatotoxicity of trivalent and hexavalent chromium compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 71:S40-S45.
- De Flora S, Serra D, Camoirano A, Zanacchi P. 1989. Metabolic reduction of chromium, as related to its carcinogenic properties. *Biol Trace Elem Res* 21:179-187.
- De Tata V, Bombara M, Novelli M, Pingitore R, Bergamini E. 1998. Glycated plasma proteins in experimentally induced acute toxic renal failure by dichromate injection: evidence for loss with urine and decreased plasma levels. *Int. J. Exp. Pathol* 79:141-149.
- Deno H, Kato A, Shinozaki K, Sugiura M. 1982. Nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for elongator tRNAMet and tRNAVal (UAC): the tRNAVal (UAC) gene contains a long intron. *Nucleic Acids Res* 10:7511-7520.
- Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. 1994. Renal failure and nephrotoxic drug-induced disturbances in rat kidney tissue. *Ren Fail* 16:687-696.
- Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell injury in acute renal failure. *Pharmacol Res* 52:44-59.
- Dickson DW. 2007. Linking selective vulnerability to cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Am J Pathol* 170:16-19.
- Drel VR, Pacher P, Stevens MJ, Obrosova IG. 2006. Aldose reductase inhibition counteracts nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic rat kidney and high-glucose-exposed human mesangial cells. *Free Radic Biol Med* 40:1454-1465.
- Eberhardt E. 2001. Cultural and medical history of snoring. How to fell trees during sleep. *MMW Fortschr Med* 143:1-53.
- Fanelli SL, Castro GD, de Toranzo EG, Castro JA. 1998. Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide; diallyl disulfide; allyl mercaptan and allyl methyl sulfide. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 102:163-174.
- Fatima S, Arivarasu NA, Banday AA, Yusufi AN, Mahmood R. 2005. Effect of potassium dichromate on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Hum Exp Toxicol* 24:631-638.
- Firdaus WJ, Wyttenbach A, Giuliano P, Kretz-Remy C, Currie RW, Arrigo AP. 2006. Huntingtin inclusion bodies are iron-dependent centers of oxidative events. *FEBS J* 273:5428-5441.
- Floriano-Sanchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sanchez-Gonzalez DJ, Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res* 40:523-533.

- Fólder S, Blackwood J. 1991. *Garlic Nature's original Remedy; Healing Asts Pess*: Rochester, Vermont.
- Francescato HD, Costa RS, Scavone C, Coimbra TM. 2007. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology* 230:64-75.
- Freeman BA, Crapo JD. 1996. Radicals generated by bone cutting and fracture. *Free Radic Biol Med* 20:831-835.
- Frei B. 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97:5S-13S.
- Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272:18515-18517.
- Fujimoto N, Kohta R, Kitamura S, Honda H. 2004. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA). *Life Sci* 74:1417-1425.
- Gardner KD, Reed W, Evans A, Hylarides M, Leone A. 1987. Endotoxin provocation of experimental renal cystic disease. *Kidney Int* 32: 329-334.
- Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Acudiere 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* 11:1176-1183.
- Goodman T, Grice HC, Becking GC, Salem FA. 1970. A cystic nephropathy induced by nordihydroguaiaretic acid in the rat. Light and electron microscopic investigations. *Lab Invest.* 23:93-107.
- Gordon-Shaag A, Yosef Y, Abd El-Latif M, Oppenheim A. 2003. The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J Virol* 77:4273-4282.
- Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR. 2006. Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 342:184-190.
- Goth L. 2006. Reactive oxygen species, hydrogen peroxide, catalase and diabetes mellitus. *Redox Rep* 11:281-282.
- Groenbaek K, Friis H, Hansen M, Ring-Larsen H, Krarup HB. 2006. The effect of antioxidant supplementation on hepatitis C viral load, transaminases and oxidative status: a randomized trial among chronic hepatitis C virus-infected patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18:985-989.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 15:129-135.
- Guyton. 1997. *Tratado de Fisiología Médica*. Mc Graw Hill Interamericana, 9ª ed. pp 296-301.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. 2006. *Free radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 33:601-617.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1999. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. Oxford, University Press. USA. pp. 48-94.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721-724.
- Halliwell B. 1996a. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 25:57-74.
- Halliwell B. 1996b. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 24:1023-1027.
- Hayashi Y, Kondo T, Zhao QL, Ogawa R, Cui ZG, Feril LB Jr, Teranishi H, Kasuya M. 2004. Signal transduction of p53-independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*.197:96-106.
- Hojo Y, Satomi Y. 1991. In vivo nephrotoxicity induced in mice by chromium(VI). Involvement of glutathione and chromium(V). *Biol Trace Elem Res* 31:21-31.
- Holum. 2001. *Fundamentos de Química General, Orgánica y Bioquímica para Ciencias de la Salud*. Limusa Wiley.
- Huang YL, Chen CY, Sheu JY, Chuang IC, Pan JH, Lin TH. 1999. Lipid peroxidation in workers exposed to hexavalent chromium. *J Toxicol Environ Health A* 56:235-247.

- Ide N, Matsuura H, Itakura Y. 1996. Scavenging effect of aged garlic extract and its constituents on active oxygen species. *Phytother Res* 10:340–341.
- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 60:417-420.
- Iqbal M, Ather M. 1998. Attenuation of iron-nitritotriacetate (Fe-NTA) mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem Toxicol* 36:485-495.
- Iseri S, Ercan F, Gedik N, Yuksel M, Alican I. 2007. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology* 230:256-264.
- Ismail MF, Gad MZ, Hamdy MA. 1999. Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic and ginseng in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol Res* 39:157-166.
- Jagtap P, Soriano FG, Virág L, Liaudet L, Mabley J, Szabó E, Hasko G, Marton A, Lorigados CB, Gallyas F Jr, Sumegi B, Hoyt DG, Baloglu E, VanDuzer J, Salzman AL, Southan GJ, Szabó C. 2002. Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. *Crit Care Med* 30:1071-1082.
- Jairo MT, Carvajar RM, Gaitán AM. 2004. Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 52:50-61.
- Jones P, Kortenkamp A, O'Brien P, Wang G, Yang G. 1991. Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium(V) intermediate isolated from the reaction of chromate with glutathione. *Arch Biochem Biophys* 286:652-655.
- Jung D, Biggs H, Erikson J, Ledyard PU. 1975. New Colorimetric reaction for end-point, continuousflow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 21:1136-1140.
- Jung K, Priem F, Henke W, Klotzek S, Becker S. 1991. Evaluation of methods for determining N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine of rats without purification of urine samples. *J Exp Anim Sci* 34:147-52.
- Kamada H, Yu F, Nito C, Chan PH. 2007. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction. *Stroke* 38:1044-1049.
- Katz D, Mazor D, Dvilansky A, Meyerstein N. 1996. Effect of radiation on red cell membrane and intracellular oxidative defense systems. *Free Radic Res* 24:199-204.
- Kawanishi S, Inoue S, Sano S. 1986. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. *Biol Chem* 261:5952-5958.
- Kempaiiah RK, Srinivasan K. 2004. Influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on the antioxidant status of red blood cells and the liver in high-fat-fed rats. *Ann Nutr Metab* 48:314-320.
- Khan LA, Miles RJ, Nicholas RA. 2005. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂. *Vet Res Commun* 29:181-188.
- Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Rao Naidu MU, Prayag A, Kutala VK. 2006. Spirulina attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 26:444-451.
- Kim E, Na KJ. 1991. Nephrotoxicity of sodium dichromate depending on the route of administration. *Arch Toxicol* 65:537-541
- Kim JM, Lee JC, Chang N, Chun HS, Kim WK. 2006. S-Allyl-L-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. *Free Radic Res* 40:827-835.
- Kiningham RB. 1998. Physical activity and the primary prevention of cancer. *Prim Care* 25:515-536.
- Koch HP, Lawson LD. 1996. Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species; William & Wilkins. Baltimore.
- Kocic R, Radenkovic S, Mikic D, Kocic G, Cvetkovic T, Pavlovic D. 1998. Oxidative stress in the development of diabetes during hyperthyroidism. *Postgrad Med J* 103:74-81.
- Kourounakis PN, Rekkas EA. 1991. Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 74:249-252.
- Kraus WL, Lis JT. 2003. PARP goes transcription. *Cell* 113:677-683.
- Kuhad A, Tirkey N, Pilkhwai S, Chopra K. 2006. Effect of Spirulina, a blue green algae, on gentamicin-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 20:121-128.

- Kweon S, Park KA, Choi H. 2003. Chemopreventive effect of garlic powder diet in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Life Sci* 73:2515-2526.
- Kwon MJ, Song YS, Choi MS, Park SJ, Jeong KS, Song YO. 2003. Cholesteryl ester transfer protein activity and atherogenic parameters in rabbits supplemented with cholesterol and garlic powder. *Life Sci* 72:2953-2964.
- La E, Kern JC, Atarod EB, Kehrer JP. 2003. Fatty acid release and oxidation are factors in lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis. *Toxicol Lett* 138:193-203.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6348-6352.
- Lamb EJ. 2005. Effect of a compensated Jaffe creatinine method on the estimation of glomerular filtration rate. *Ann Clin Biochem* 42(Pt 2):160-171.
- Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT. 2002. Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 40:1701-1708.
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res Commun* 71:952-958.
- Lawson LD. Garlic. 1998. A revive of its medicinal effects and indicated active compounds. En Lawson LD & Bauer R, eds. *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity* American Chemical Society Symposium series 691. Washington D pp 176-290.
- Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Therond P, Torreilles J. 1998. [Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances] *Ann Biol Clin* 56:305-319.
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE. 2003. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23:5919-5927.
- Lewin G, Popov L. 1994. Antioxidant effects of aqueous extract. 2nd communication: inhibition of the Cu(2+)-initiated oxidation of low density lipoproteins. *Arzneimittel-Forschung* 44:604-607.
- Li F, Szabó C, Pacher P, Southan GJ, Abatan OI, Charniauskaia T, Stevens MJ, Obrosova IG. 2004. Evaluation of orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in streptozotocin-diabetic rat model of early peripheral neuropathy. *Diabetologia* 47:710-717.
- Liaudet L, Pacher P, Mabley GJ, Virág L, Soriano GF, Haskó G, Szabó C. 2002. Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 165:372-377.
- Liu KJ, Shi X. 2001. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222:41-47.
- Liu S, Medvedovic M, Dixon K. 1999a. Mutational specificity in a shuttle vector replicating in chromium(VI)-treated mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 33:313-319.
- Liu X, Lu J, Liu S. 1999b. Synergistic induction of hydroxyl radical-induced DNA single-strand breaks by chromium(VI) compound and cigarette smoke solution. *Mutat Res* 440:109-117.
- Lo Bello M, Nuccetelli M, Caccuri AM, Stella L, Parker MW, Rossjohn J, McKinstry WJ, Mozzi AF, Federici G, Polizio F, Pedersen JZ, Ricci G. 2001. Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide carriers; a new role for an old enzyme. *J Biol Chem* 276:42138-42145.
- Lobo SM, Orrico SR, Queiroz MM, Cunrath GS, Chibeni GS, Contrin LM, Cury PM, Burdmann EA, de Oliveira Machado AM, Togni P, De Backer D, Preiser JC, Szabó C, Vincent JL. 2005. Pneumonia-induced sepsis and gut injury: effects of a poly-(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *J Surg Res* 129:292-297.
- Loftus JP, Belknap JK, Stankiewicz KM, Black SJ. 2007. Laminar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. *Equine Vet J* 39:48-53
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mabley GJ, Paché P, Bai P, Wallace R, Goonesekera S, Virág L, Southan JG, Szabó C. 2004. Suppression of intestinal polyposis in Apcmin/+ mice by targeting the nitric oxide or poly(ADP-ribose) pathways. *Mutat Res.* 548:107-116.

- Mabley JG, Jagtap P, Perretti M, Getting SJ, Salzman AL, Virág L, Szabó E, Soriano FG, Liaudet L, Abdelkarim GE, Hasko G, Marton A, Southan GJ, Szabó C. 2001. Anti-inflammatory effects of a novel, potent inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase. *Inflamm Res* 50:561-569.
- Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003a. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sci* 73:2543-2556.
- Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. 2003. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 35:317-324.
- Maldonado PD, Chanez-Cardenas ME, Pedraza-Chaverri J. 2005. Aged garlic extract, garlic powder extract, S-allylcysteine, diallyl sulfide and diallyl disulfide do not interfere with the antibiotic activity of gentamicin. *Phytother Res* 19:252-254.
- Mancuso C, Scapagini G, Curro D, Giuffrida Stella AM, De Marco C, Butterfield DA, Calabrese V. 2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* 12:1107-23.
- Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. 2006. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 10:59-73.
- Manfred K, Eberhardt PHD. 2001. Reactive oxygen metabolites. Chemistry and medical consequences. CRC press LLC USA. pp. 303-378.
- Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khatib MM, Al-Shabanah OA. 2002. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132:123-128.
- Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, Poznansky MJ. 1993. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *J Biol Chem* 268:416-420.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.
- Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. 1991. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2166-2170.
- Muniyappa K, Kironmai KM. 1998. Telomere structure, replication and length maintenance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33:297-336.
- Na KJ, Jeong SY, Lim CH. 1992. The role of glutathione in the acute nephrotoxicity of sodium dichromate. *Arch Toxicol* 66:646-651.
- Nagayama T, Simon RP, Chen D, Henshall DC, Pei W, Stetler RA, Chen J. 2000. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in the rat hippocampus may contribute to cellular recovery following sublethal transient global ischemia. *J Neurochem* 74:1636-1645.
- Natochin YV, Bakhteeva VT, Karpenko LA. 2006. 6-Gingerol prevents cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Biofactors* 26:189-200.
- Newman M, Musgrave FI, Lardelli M. 2007. Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim Biophys Acta* 1772:285-297.
- Nishimura K, Tsumagari H, Setoyama T, Morioka A, Lu S, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K. 2004. Prostaglandin F(2alpha) is protective for apoptosis stimulated synergistically with 12-O-tetradecanoyl phorbol-beta-acetate and nordihydroguaiaretic acid in Madin-Darby canine kidney cells. *Biochim Biophys Acta* 1682:102-111.
- Numagami Y, Ohnishi ST. 2001. S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neuronal damage in rat brain ischemia. *J Nutr* 131:1100S-1105S.
- Numagami Y, Sato S, Ohnishi ST. 1996. Attenuation of rat ischemic brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int* 29:135-143.
- Oboh G. 2006. Tropical green leafy vegetables prevent garlic-induced hepatotoxicity in the rat. *J Med Food* 9:545-551.
- Obrosova IG, Julius UA. 2005. Role for poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic nephropathy, neuropathy and retinopathy. *Curr Vasc Pharmacol* 3:267-283.

- Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *Am J Hum Genet* 64:1282-1288.
- Orozco-Ibarra M, Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. 2006. [Role of hemeoxygenase-1 in the neurodegenerative disorders] *Rev Neurol* 43:556-562.
- Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sanchez-Gonzalez DJ, Martinez-Martinez CM, Floriano-Sanchez E, Santamaria A, Ramirez V, Bobadilla NA, Pedraza-Chaverri J. 2007. Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology* 229:123-135.
- Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabó E, Szabó C. 2002. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes* 51:514-521.
- Padmanabhan M, Prince PS. 2006. Preventive effect of S-allylcysteine on lipid peroxides and antioxidants in normal and isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats: a histopathological study. *Toxicology* 224:128-137.
- Patel V, Luft FC, Yum MN, Patel B, zeman W, Klett SA. 1975. Enzymuria in gentamicin-induced kidney damage. *Antimicrob Agents Chemother* 7:364-369.
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macias-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernandez-Pando R. 2004a. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clin Pharmacol* 4:1-5.
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Medina-Campos ON, Carvajal RC, Hernandez-Pando R, Macias-Ruvalcaba NA, Maldonado PD, Salcedo MI, Tapia E, Saldivar L, Castilla ME, Ibarra-Rubio ME. 2005. Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K2Cr2O7-induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol* 61:1-4.
- Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Larriva-Sahd J, Juárez RM, Orozco H, Hernández-Pando R, Tapia E. 1995a. Angiotensin I converting enzyme in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Ren. Fail* 17:365-375.
- Pedraza-Chaverri J, Gil-Ortiz M, Albarran G, Barbachano-Esparza L, Menjivar M, Medina-Campos ON. 2004b. Garlic's ability to prevent in vitro Cu²⁺-induced lipoprotein oxidation in human serum is preserved in heated garlic; effect unrelated to Cu²⁺-chelation. *Nutrition Journal* 3:1-10.
- Pedraza-Chaverri J, Gonzalez-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R. 2003. Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 473:71-78.
- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000a. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 29:602-611.
- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Olivares IM, Granados-Silvestre MA, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 1999. Garlic ameliorates gentamicin (GM) nephrotoxicity: Role of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD). *J Am Soc Nephrol* 10:631A-638A.
- Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Avila-Lombardo R, Berenice Zuniga-Bustos A, Orozco-Ibarra M. 2006. Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sci* 78:761-770.
- Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM, Hernandez-Pando R. 2000b. Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminonucleoside nephrosis. *Mol Cell Biochem* 211:69-77.
- Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Segoviano-Murillo S. 2007. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food Chem Toxicol* 45:622-627.
- Pedraza-Chaverri J, Moreno-Muñiz SI, Cruz C, Hernández-Pando R, Larriva-Sahd J, Tapia E. 1995b. Urinary angiotensin I-converting enzyme activity is increased in experimental acute renal failure. *Clin Invest Med* 18:424-434.
- Pieper AA, Brat DJ, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH. 1999b. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3059-3064.
- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. 1999a. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20:171-181.

- Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A. 1995. NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med* 19:553-563.
- Pourahmad J, O'Brien PJ. 2001. Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Adv Exp Med Biol* 500:203-207.
- Prasad K, Laxdal VA, Yu M, Raney BL. 1995. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Mol Cell Biochem*. 148:183-189.
- Pritchard KA Jr, Ackerman A, Kalyanaraman B. 2000. Chromium (VI) increases endothelial cell expression of ICAM-1 and decreases nitric oxide activity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:251-260.
- Rahman I, Biswas SK, Kode A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533:222-239.
- Ren D, Sun R, Wang S. 2006. Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in high mobility group box 1--induced acute lung injury. *Inflamm Res* 55:207-215.
- Reznick A, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-363.
- Rietz B, Isensee H, Strobach H, Makdessi S, Jacob R. 1993. Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 119:143-150.
- Robinson TW, Sevenian A, Forman H. 1990. Inhibition of arachidonic acid release by nordihydroguaiaretic acid and its antioxidant action in rat alveolar macrophages and Chinese hamster lung fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 105:113-122.
- Rodríguez E, García AM, Foyo E, Amato D, Paniagua R. 2003. Role of thyroid hormones on the synthesis and release of atrial natriuretic peptide in rats with acute renal failure. *Nephron Exp Nephrol*. 95:e24-e29.
- Rothman SM, Yamada KA, Lancaster N. 1993. Nordihydroguaiaretic acid attenuates NMDA neurotoxicity--action beyond the receptor. *Neuropharmacology* 32:1279-1288.
- Ruegg CE, Gandolfi AJ, Nagle RB, Brendel K. 1995. Urinary angiotensin I-converting enzyme activity is increased in experimental acute renal failure. *Clin Invest Med* 18:424-434.
- Ryszawa N, Kawczynska-Drozd A, Pryjma J, Czesnikiewicz-Guzik M, Adamek-Guzik T, Naruszewicz M, Korbut R, Guzik TJ. 2006. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 57:611-626.
- Sahin M, Avsar FM, Ozel H, Topaloglu S, Yilmaz B, Pasaoglu H, Avunduk MC, Erikoglu M, Hengirmen S. 2004. The effects of dimethyl sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 36:2590-2592.
- Sahu SC, Ruggles DI, O'Donnell MW. 2006. Prooxidant activity and toxicity of nordihydroguaiaretic acid in clone-9 rat hepatocyte cultures. *Food Chem Toxicol* 44:1751-1757.
- Sanchez-Gonzalez DJ, Moro MA, Castillo-Henkel C, Herrera-Gonzalez N, Hernandez-Pando R, Larios-Medina FJ, Cobilt R, Blanco JA, Pedraza-Chaverri J, Villanueva C. 2004. Ozone exposure induces iNOS expression and tyrosine nitration in rat aorta. *Environ Toxicol Pharmacol* 17:1-7.
- Sangeetha T, Quine SD. 2006. Antilipoperoxidative and antioxidant effects of S-allyl cysteine sulfoxide on isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol* 20:167-173.
- Santos NA, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol* 81:173-182.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65:1035-1041.
- Sato T, Miyata G. 2000. The nutraceutical benefit, part iv: garlic. *Nurition* 16:787-788.
- Sawyer DT. 1988. The redox thermodynamics for dioxygen species (O₂, O₂⁻, HOO[•], HOOH, and HOO⁻) and monooxygen species (O, O⁻, OH[•], and OH⁻) in water and aprotic solvents. *Basic Life Sci* 49:11-20.
- Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. 1981. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 19:288-296.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517-528.
- Schultze-Mosgau MH, Dale IL, Gant TW, Chipman JK, Kerr DJ, Gescher A. 1998. Regulation of c-fos transcription by chemopreventive isoflavonoids and lignans in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Eur J Cancer* 34:1425-1431.

- Scott GS, Kean RB, Mikheeva T, Fabis MJ, Mabley JG, Szabó C, Hooper DC. 2004b. The therapeutic effects of PJ34 [N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl], a selective inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, in experimental allergic encephalomyelitis are associated with immunomodulation. *J Pharmacol Exp Ther* 310:1053-1061.
- Scott GS, Szabó C, Hooper DC. 2004a. Poly(ADP-ribose) polymerase activity contributes to peroxynitrite-induced spinal cord neuronal cell death in vitro. *J Neurotrauma* 21:1255-1263.
- Sengupta T, Chattopadhyay D, Ghosh N, Maulik G, Chatterjee GC. 1992. Impact of chromium on lipoperoxidative processes and subsequent operation of the glutathione cycle in rat renal system. *Indian J Biochem Biophys* 29:287-290.
- Shall S, De Murcia G. 2000. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460:1-15.
- Shang L, Liu J, Zhu Q, Zhao L, Feng Y, Wang X, Cao W, Xin H. 2005. Gypenosides protect primary cultures of rat cortical cells against oxidative neurotoxicity. *Brain Res* 1102:163-174.
- Sharma G, Italia JL, Sonaje K, Tikoo K, Ravi Kumar MN. 2007. Biodegradable in situ gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: Evaluation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats. *J Control Release* 118:27-37.
- Shi L, Pardini RS. 1995. Effect of NDGA on beef heart mitochondria and EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 90:235-254.
- Shi XL, Dalal NS. 1989. Chromium (V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium (VI). *Biochem Biophys Res Commun* 163:627-634.
- Shishido Y, Furushiro M, Hashimoto S, Yokokura T. 2001. Effect of nordihydroguaiaretic acid on behavioral impairment and neuronal cell death after forebrain ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 69:469-474.
- Shukla R, Rajani M, Srivastava N, Barthwal MK, Dikshit M. 2006. Nitrite and malondialdehyde content in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 116:1391-1402.
- Siegel SJ, Bieschke J, Powers ET, Kelly JW. 2007. The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry* 46:1503-1510.
- Sies H, Mehlhorn R. 1986. Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch Biochem Biophys* 251:393-396.
- Singh V, Belloir C, Siess MH, Le Bon AM. 2006. Inhibition of carcinogen-induced DNA damage in rat liver and colon by garlic powders with varying alliin content. *Nutr Cancer* 55:178-184.
- Stacchiotti A, Borsani E, Ricci F, Lavazza A, Rezzani R, Bianchi R, Rodella LF. 2006. Bimoclolmol ameliorates mercuric chloride nephrotoxicity through recruitment of stress proteins. *Toxicol Lett* 166:168-177.
- Stadtman ER. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9:315-325.
- Standeven AM, Wetterhahn KE. 1991. Possible role of glutathione in chromium(VI) metabolism and toxicity in rats. *Pharmacol Toxicol* 68:469-476.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:201-213.
- Stone DH, Al-Badawi H, Conrad MF, Stoner MC, Entabi F, Cambria RP, Watkins MT. 2005. PJ34, a poly-ADP-ribose polymerase inhibitor, modulates renal injury after thoracic aortic ischemia/reperfusion. *Surgery* 138:368-374.
- Sugiyama M, Tsuzuki K, Lin X, Costa M. 1992. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 12:397-407.
- Sumioka I, Matura T, Kasuga S, Itakura Y, Yamada K. 1998. Mechanisms of protection by S-allylmercaptocysteine against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Jpn J Pharmacol* 78:199-207.
- Surdacki A, Martens-Lobenhoffer J, Wloch A, Marewicz E, Rakowski T, Wiczorek-Surdacka E, Dubiel JS, Pryjma J, Bode-Boger SM. 2007. Elevated plasma asymmetric dimethyl-L-arginine levels are linked to endothelial progenitor cell depletion and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:809-819.
- Symons MC. 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91:2S-13S.
- Szabó C, Biser A, Benko R, Bottinger E, Susztak K. 2006a. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice. *Diabetes*. 55:3004-3012.
- Szabó C, Dawson VL. 1998. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 19:287-298.

- Szabó C, Pacher P, Swanson RA. 2006b. Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. *Trends Pharmacol Sci* 27:626-630.
- Tan RJ, Lee JS, Manni ML, Fattman CL, Tobolewski JM, Zheng M, Kolls JK, Martin TR, Oury TD. 2006. Inflammatory cells as a source of airspace extracellular superoxide dismutase after pulmonary injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:226-232.
- Tang DG, Guan KL, Li L, Honn KV, Chen YQ, Rice RL, Taylor JD, Porter AT. 1997. Suppression of W256 carcinosarcoma cell apoptosis by arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids. *Int J Cancer* 72:929-935.
- Tasatargil A, Dalaklioglu S, Sadan G. 2005. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase prevents vascular hyporesponsiveness induced by lipopolysaccharide in isolated rat aorta. *Pharmacol Res* 51:581-586.
- Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, Tsikas D, Ertl G, Bauersachs J. 2007. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 56:666-674.
- Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. 2002. Lipoygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 1:929-935.
- Torok B, Belagyi J, Rietz B, Jacob R. 1994. Effectiveness of garlic on the radical activity in radical generating systems. *Arzneimittel-Forschung* 44:608-611.
- Torzewski M, Ochsenhirt V, Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Li H, Rossmann H, Tsimikas S, Reifenberg K, Cheng F, Lehr HA, Blankenberg S, Forstermann U, Munzel T, Lackner KJ. 2007. Deficiency of Glutathione Peroxidase-1 Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:621-627.
- Travacio M, Polo JM, Llesuy S. 2001. Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology* 162:139-148.
- Tulin A, Spradling A. 2003. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* 299:560-562.
- Uchiyama S, Shimizu T, Shirasawa T. 2006. CuZn-SOD deficiency causes ApoB degradation and induces hepatic lipid accumulation by impaired lipoprotein secretion in mice. *J Biol Chem* 281:31713-31719.
- Velasco-Velazquez MA, Maldonado PD, Barrera D, Torres V, Zentella-Dehesa A, Pedraza-Chaverri J. 1998. Role of angiotensin II, endothelin-1, and nitric oxide in HgCl₂-induced acute renal failure. *Toxicol Appl Pharmacol* 152:315-326.
- Vimal, V. and Devaki, T. (2004) Hepatoprotective effect of allicin on tissue defense system in galactosamine/endotoxin challenged rats. *J. Ethnopharmacol* 90:151-154.
- Virág L, Szabó C. 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54:375-429.
- Wang T, Weinman SA. 2006. Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 213:S34-S37.
- Wardman P, Candeias LP. 1996. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 145:523-531.
- Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SR. 2003. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci* 105:425-430.
- Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, Kim PM, Laposa RR, McCallum GP, Nicol CJ, Parman T, Wiley MJ, Wong AW. 2005. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:354-366.
- Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. 1976. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl-B-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 69:85-91.
- Wiernikowski A. 1991. Clinical and toxicologic problems related to acute poisoning with chromium. *Pol Tyg Lek* 46:448-451.
- Wiseman H, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313:17-29.
- Wongmekiat O, Thamprasert K. 2005. Investigating the protective effects of aged garlic extract on cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 19:555-562.
- Wu XJ, Kassie F, Mersch-Sundermann V. 2005. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutat Res* 579:115-124.

- Xiao H, Parkin DL. 2002. Antioxidant functions of selected allium thiosulfinates and S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides. *J Agric Food Chem* 50:2488-2493.
- Xie Y, Zhuang ZX. 2001. Chromium (VI)-induced production of reactive oxygen species, change of plasma membrane potential and dissipation of mitochondria membrane potential in Chinese hamster lung cell cultures. *Biomed Environ Sci* 14:199-206.
- Yanagisawa H. 1998. HgCl₂-induced acute renal failure and its pathophysiology. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 52:618-23.
- Yang GC, Yasaei MP, Page SW. 1993. Garlic as antioxidant and free radical scavenger. *J food Drug Anal* 1:357-364.
- Yousef MI, El-Demerdash FM, Kamil KI, Elasad FA. 2006. Ameliorating effect of folic acid on chromium(VI)-induced changes in reproductive performance and seminal plasma biochemistry in male rabbits. *Reprod Toxicol* 21:322-328.
- Zheng J, Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F387-F398.
- Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. 2007. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res* 1138:86-94.
- Zhou J, Xing D, Chen Q. 2006. Enhancement of fluoresceinyl cypridina luciferin analog chemiluminescence by human serum albumin for singlet oxygen detection. *Photochem Photobiol* 82:1058-1064.
- Zitnanova I, Sumegova K, Simko M, Maruniakova A, Chovanova Z, Chavko M, Durackova Z. 2006. Protein carbonyls as a biomarker of foetal-neonatal hypoxic stress. *Clin Biochem* 39: 1045-1108.