

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO,
ANIÓN SUPERÓXIDO, RADICAL HIDROXILO
Y SINGULETE DE OXÍGENO EN LA TOXICIDAD POR
 $K_2Cr_2O_7$ EN CÉLULAS LLC-PK1.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MIRIAM GABRIELA CARRANZA PÉREZ



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: Profesor: José Pedraza Chaverrí
Vocal: Profesora: Perla Carolina Castañeda López
Secretario: Profesora: Diana Barrera Oviedo
1er. Suplente: Profesora: Martha Patricia Coello Coutiño
2º Suplente: Profesora: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Farmacología, Laboratorio 5. Sexto piso, Torre de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM, México D. F.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN229505 y CONACYT 47993-M.

La alumna Miriam Gabriela Carranza Pérez (No. de cuenta 40105064-6) recibió becas por parte del proyecto PAPIIT IN229505 (Beca de “licenciatura” 2005 y Beca de “tesis de licenciatura” 2006)

Asesora: _____
Dra. Diana Barrera Oviedo

Sustentante: _____
Miriam Gabriela Carranza Pérez

Gracias:

J., por estar siempre a mi lado y ser quien día a día me da ánimo para seguir adelante aunque la situación parezca difícil; sin tu intervención en mi vida creo que jamás hubiera llegado a ningún lado.

Gregoria Pérez y Jesús Carranza (Mamá y Papá) por darme siempre lo mejor y permitirme ser libre para tomar cualquier decisión por loca que pareciera, por estar ahí cuando los necesité y por ser mis superhéroes. Diana por ser mi hermanita, por siempre poner mis pies sobre la tierra y por esos momentos únicos. Abue Luisa por consentirme todo este tiempo y enseñarme tantas cosas. Lucy por 18 años de apapachos y de ser tu niña consentida. Lupita y Francisco por compartir tantos momentos y por ser como mis hermanos mayores. Tere por llegar a la familia. Diego, Karelly, Erick, Catherine y Violeta por traer alegría e inocencia a mi vida. A mis tías y tíos paternos por el cariño y las porras. A mis primos, especialmente a Luis y Octavio por darme una gran lección de vida. A mis abuelos Isabel y Jesús me hubiera gustado que estuvieran aquí, sin embargo espero que esto los haga sentir orgullosos de mí.

A mi pedacito de cielo (Evelyn) por aquellas noches en vela mientras yo estudiaba, por llenar mi vida con tu amor, sabes cuan importante eres para mí y que esto también va por ti.

A todos aquellos seres que con su presencia llenaron mi vida de alegría y me dieron su cariño, especialmente a Duke por las aventuras, los juegos y por ser tan especial.

A quienes intervinieron en mi formación académica, especialmente a Isabel Ríos y Sergio Tejeda por despertar mi interés en la Química.

A todo el Instituto Marillac, a mis profesores: Ernesto Hernández, Ernestina Vivas, Cecilia Aviña, Paty Camarena, Elsa Vázquez, Rubén Vergara, Coco Álvarez, Gregoria Flores, Blanca Ortega, Jesús Martínez, Amadeo Orlandini, Rosa Elena Aburto, Miriam Collado, Carmen Olea, Miguel Manzano, Fernando Mejía, Ricardo Borja[†], por ser grandes personas y por lo que me enseñaron. A Sor María de Jesús por sus consejos y lo que estos dieron a mi vida. A Lili Serrano por compartir tantos momentos, por reírse de mis tonterías y porque a pesar del tiempo y la distancia se acuerda de mí. A Caro Vázquez, Paulina Mendoza, Laura Moctezuma, Araceli Granados, Vero Martínez y Karina Sandoval por enseñarme el significado de la amistad y tratar de hacerme una mejor persona. A DAX por formar parte de los años más felices de mi vida.

A mis amigos en la Facultad de Química especialmente a Luz Medina, Lucy Flores, Sazitl Jardón, Sony Reyes y Alfonso Hernández por aguantarme tanto tiempo. A quienes fueron mi equipo y con quienes la pasé muy bien: Arturo Cortés, Fernando Belmont, Pablo Téllez, Gustavo Ramírez, Ajax, Dulce Karina Castro, Marx Sánchez, Carlos Juárez, Lorena García, Víctor Lemus, Esther Méndez, Olimpia Pérez, Roxana Gutiérrez, Cecilia Padierna, Gisela García, Agustín, Carmen Flores, Miriam Anaya, Nancy Villar, Ericka García, Richie Hernández y Paty Cuautle. A “Filos” (CIPG) por atravesarse en mi camino.

Al M. en C. Pedro Villanueva por su amistad, los consejos y el apoyo durante todos estos años.

Al laboratorio de Química del área de Servicios Periciales en la PGJDF, especialmente a la IBQ. Guadalupe López, la QFB. Gabriela Cortés y la QFB. Adriana Ramírez por el cariño y el apoyo brindado durante mi servicio social.

Ana y Bety por las lecciones de laboratorio. Ale y Mario por las aventuras y su amistad. Lilian por los consejos y tu amistad.

Juanita y Amelia por todas las atenciones mientras compartimos laboratorio.

Al Dr. Juan Molina Guarneros, Dr. José Pedraza Chaverrí y Dr. Marco A. Velasco Velázquez, así como a sus equipos de trabajo, por otorgarnos las facilidades para la realización de este trabajo. A Omar Medina y Nohemí Salinas por su apoyo y disponibilidad.

Al Dr. Nicandro Mendoza Patiño por brindarnos su apoyo y colaborar en el análisis estadístico de este trabajo.

Por último a la Dra. Diana Barrera por las lecciones de ciencia y de vida, por brindarme su comprensión, apoyo y confianza en todo momento; por tenerme paciencia y asesorar esta tesis. Pero sobretodo por ser una gran persona y por su amistad.

ÍNDICE

I. Antecedentes	1
1. Especies reactivas y estrés oxidativo	1
1.1. Radicales libres	1
1.2. Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno	1
1.2.1. Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	2
1.2.2. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	4
1.2.3. Radical hidroxilo ($\bullet OH$)	5
1.2.4. Singulete de oxígeno (1O_2)	5
1.2.5. Otras especies reactivas	6
1.3. Estrés oxidativo	6
1.4. Determinación de ERO y ERN	7
1.5. Antioxidantes	11
2. Cromo	11
2.1. Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)	11
3. Riñón	12
3.1. Nefrona	12
3.1.1. Importancia del túbulo proximal	15
3.2. Nefropatías	15
3.2.1. Insuficiencia renal aguda (IRA)	15
3.2.1.1. Insuficiencia renal aguda intrarrenal	16
3.2.2. Insuficiencia renal crónica (IRC)	17
II. Introducción	18
III. Hipótesis	19
IV. Objetivo general	19
V. Objetivos específicos	19
VI. Materiales y métodos	20
1. Reactivos	20
2. Cultivo de células	20
3. Modelo de estudio	21
4. Cuantificación de proteínas	21
5. Ensayo de viabilidad	22

6. Determinación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	22
7. Determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	23
8. Determinación de radical hidroxilo ($\bullet OH$)	23
9. Determinación de singlete de oxígeno (1O_2)	24
VII. Resultados	24
VIII. Discusión	32
IX. Conclusiones	35
X. Bibliografía	35

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) incluyen radicales libres de oxígeno y cualquier otra molécula que contenga oxígeno más reactivo que el oxígeno molecular (O_2). Las ERO se originan a partir de la reducción incompleta de O_2 en el metabolismo normal de las células, incluyen especies como: anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$) y singulete de oxígeno (1O_2), entre otras. Un aumento en las especies reactivas genera un estado de estrés oxidativo relacionado con el envejecimiento y numerosas enfermedades humanas. Para diferenciar entre efectos fisiológicos y patológicos es necesario identificar y cuantificar las ERO. En este trabajo se determinó la presencia de $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , $\bullet OH$ y 1O_2 en células de túbulo proximal de riñón de cerdo expuestas a $K_2Cr_2O_7$ 40 μM a lo largo de 24 h.

Metodología: Se determinó la viabilidad celular con el método de cristal violeta. Se tomaron fotografías para determinar el daño estructural causado por el $K_2Cr_2O_7$. Se adaptaron 4 métodos para la determinación de las ERO: El $O_2^{\bullet -}$ se midió con el método de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT), el H_2O_2 se midió con el método de hierro 3+/naranja de xilenol (FOX), el $\bullet OH$ se midió por la degradación de desoxiribosa con el método de ácido tiobarbitúrico y el 1O_2 fue determinado por el método de la *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina (DMNA).

Resultados: La viabilidad para las células tratadas con $K_2Cr_2O_7$ disminuyó conforme pasó el tiempo, se observaron células muertas desde las 3 h de exposición a $K_2Cr_2O_7$. Se observó y cuantificó cerca del 50% de viabilidad celular a las 24 h de tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ 40 μM . Se encontró que tanto en células tratadas con $K_2Cr_2O_7$ 40 μM como en sus medios de incubación hubo un aumento de las 4 ERO a través del tiempo. Este comportamiento semejante en ambos grupos (control y $K_2Cr_2O_7$) se diferenció en varios tiempos de la exposición a $K_2Cr_2O_7$. Se presentó un pico de producción de H_2O_2 a las 18 h y de 1O_2 a las 21 h, en las células expuestas a $K_2Cr_2O_7$. Además de un pico de producción de $O_2^{\bullet -}$ a las 21 h y un aumento constante de H_2O_2 en el medio de incubación que contenía $K_2Cr_2O_7$.

Conclusiones: $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, y 1O_2 están presentes en la toxicidad por $K_2Cr_2O_7$ en las células LLC-PK1 y aumentan con el tiempo de exposición. Es posible que el H_2O_2 extracelular inicie el daño en la toxicidad por $K_2Cr_2O_7$.

I. ANTECEDENTES

1. ESPECIES REACTIVAS Y ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. RADICALES LIBRES

Un radical libre es cualquier especie molecular que contiene uno o más electrones desapareados y es capaz de existir independientemente. También se les conoce como agentes oxidantes. Un radical libre se puede formar por la ganancia o pérdida de un solo electrón de cualquier molécula. Existe un amplio espectro de especies moleculares con electrones desapareados en las células, sin embargo, son de especial interés los radicales de oxígeno.

Los radicales libres son importantes para muchos procesos fisiológicos normales. Por ejemplo, los radicales con centro de carbono que sirven como intermediarios en el transporte de electrones en la mitocondria, regulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), un proceso que, se estima utiliza 2-5% del consumo de oxígeno mitocondrial. Otro ejemplo es el papel fisiológico del óxido nítrico y otros derivados de las especies reactivas de nitrógeno (ERN) como reguladores fisiológicos del tono muscular (Murrant y Reid, 2001).

1.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y DE NITRÓGENO

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

La mitocondria es la principal fuente de producción de ERO en células eucariontes. Se estima que de 2-5% del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria escapan para producir anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (Cadenas y Davies, 2000; Chance et al., 1979; Fridovich,

1989; Sas et al., 2007). La velocidad de producción de $O_2^{\bullet-}$ de la mitocondria se ha estimado en aproximadamente 1.2 nmol/min/mg (Boveris et al., 1972). La xantina oxidasa también se ha identificado como una fuente potencial de ERO en el citosol de fibras musculares. En la conversión enzimática de hipoxantina a xantina, el $O_2^{\bullet-}$ aparece como un derivado (Apple et al., 1991; Laughlin et al., 1990; McCutchan et al., 1990). Fuentes enzimáticas adicionales de ERO pueden incluir a las NADPH-oxidasas (Duncan y Rudge, 1988; Dinger et al., 2007), monoaminoxidasa (MAO), óxido nítrico sintasa (NOS), (Sas et al., 2007) oxidasas sarcoplasmicas (Crane et al., 1985; Freeman y Crapo, 1982), y enzimas del metabolismo del ácido araquidónico incluyendo ciclooxigenasas (Okabe et al., 1985), lipoxigenasas y citocromo P450 (Freeman y Crapo, 1982), así como otras enzimas de membrana plasmática (Crane et al., 1985). Los tipos de células que liberan ERO y ERN en el espacio extracelular incluyen células endoteliales (Babbs et al., 1991; Marin y Rodríguez-Martínez, 1995; Mitchell y Tyml, 1996; Panus et al., 1993), células vasculares de músculo liso (Charpie y Webb, 1993; Mohazzab-H y Wolin, 1994), neuronas motoras (Riberia et al., 1998), leucocitos (Suzuki et al., 1996) y eritrocitos (Stamler et al., 1997). Dependiendo de la carga y la reactividad, las ERO y ERN liberadas al espacio extracelular por dichas células pueden difundir al citosol.

La molécula origen en la generación de ERO es un radical libre, el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La cascada de ERO incluye otras especies de radicales libres, incluyendo radicales hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y radicales hidropéroxilo (HOO^{\bullet}), también incluyen derivados de oxígeno que no son radicales libres, por ejemplo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (González et al., 2007). La cascada de ERN incluye como radical origen el óxido nítrico (NO^{\bullet}) y un arreglo de derivados redox activos que incluyen dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (Murrant y Reid, 2001). A continuación se muestran las ERO y ERN de importancia biológica (Roberfroid y Calderon, 1995) (Tabla 1).

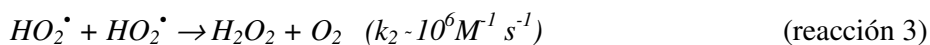
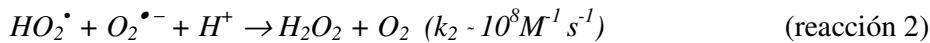
1.2.1. Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) es el radical libre más importante producido por la ganancia de un electrón en los sistemas biológicos (reacción 1), puede actuar como un agente reductor y oxidante. La difusión de $O_2^{\bullet-}$ a través de las membranas puede restringirse debido a la carga y reactividad (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1986; Rosen y

Tabla 1. Especies oxidantes reactivas de mayor importancia biológica

Especies reactivas de oxígeno (ERO)		Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	
Radicales		Radicales	
Anión superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Radical óxido nítrico	NO^{\bullet}
Radical hidroxilo	$\bullet OH$	Radical dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}
Radical peroxilo	$\bullet OOR$		
Radical perhidroxilo	$\bullet OOH$		
Radical alcoxilo	$\bullet OR$		
Radical protein hem ferrilo	$\bullet X-[Fe^{(IV)}=O]$		
No radicales		No radicales	
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Ácido nitroso	HNO_2
Ácido hipocloroso	$HOCl$	Catión nitrosilo	NO^+
Ozono	O_3	Anión nitroxilo	NO^-
Singulete de oxígeno	1O_2	Tetróxido de dinitrógeno	N_2O_4
		Trióxido de nitrógeno	N_2O_3
		Peroxinitrito	$ONOO^-$
		Alquilperoxinitritos	$ROONO$

Freeman, 1984). El $O_2^{\bullet-}$ reacciona con algunas moléculas y genera nuevos radicales libres, pero también puede reaccionar consigo mismo de tal manera que un $O_2^{\bullet-}$ se oxida a O_2 y el otro se reduce a H_2O_2 . Esto constituye la reacción de dismutación espontánea (Freeman y Crapo, 1982; Murrant y Reid, 2001). Mecánicamente, la reacción de dismutación en los fluidos biológicos ocurre por protonación de uno o ambos $O_2^{\bullet-}$ a HO_2^{\bullet} . Esta reacción de dismutación espontánea puede ocurrir de dos maneras (reacciones 2 y 3).



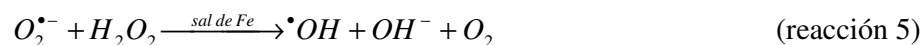
Además de la dismutación espontánea, el grupo de enzimas, superóxido dismutasas (SODs) eliminan específicamente al $O_2^{\bullet-}$.

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

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



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



1.2.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

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

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



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

1.2.3. Radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

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

1.2.4. Singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

El $^1\text{O}_2$ no tiene electrones desapareados, por lo tanto no es un radical; sin embargo es muy reactivo sobre todo con los lípidos de membrana produciendo radicales peroxilo. El $^1\text{O}_2$ se forma después de la absorción de energía cuántica, o bien como resultado de determinadas reacciones químicas, trayendo como resultado el salto de un electrón a un orbital superior y formándose un suborbital con un par de electrones con giros opuestos y un suborbital vacío (Corey et al., 1987; Khan y Kasha, 1994; Olinescu y Smith, 2002). Un ejemplo de su formación es cuando se iluminan determinados pigmentos en presencia de oxígeno (Huberman, 1995), por ejemplo clorofila, retinal, flavinas y porfirinas. El $^1\text{O}_2$ tiende a

formarse en grandes cantidades en tejidos y órganos sometidos a radiaciones ionizantes terapéuticas (Yu, 1994).

1.2.5. Otras especies reactivas

Aunque las ERO más importantes son H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet OH$, hay otras ERO que son radicales libres como el radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), los radicales alcoxil (RO^{\bullet}) y los radicales peroxil (RO_2^{\bullet}). De hecho HO_2^{\bullet} es el radical peroxil más simple. En otros radicales libres en los que el átomo reactivo no es oxígeno se agrupa la mayoría de los radicales biológicamente relevantes entre los que se encuentran: (1) metales de transición como hierro, cobre y manganeso que tienen varios electrones desapareados y dos números de oxidación principales (Fe^{2+} y Fe^{3+} ; Cu^+ y Cu^{2+} ; Mn^{2+} y Mn^{3+}) permitiéndoles aceptar o donar un electrón; (2) radicales con centro de carbono formados por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un enlace C-H (reacción 7); (3) radicales con centro de azufre (radicales tiil) formados en la reacción de moléculas que contienen SH con metales de la transición (glutation reducido, reacción 8) o por rompimiento homolítico de enlaces disulfuro en las proteínas u oxidación del glutatión (reacción 9) (González et al., 2007).



1.3. ESTRÉS OXIDATIVO

Un aumento en los niveles de ERO o radicales libres crea estrés oxidativo resultado de un desequilibrio en el balance redox. El estrés oxidativo lleva a lesiones bioquímicas y fisiológicas las cuales pueden deteriorar el metabolismo, causando daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que eventualmente resulta en muerte celular (Heinonen et al., 1998; Rice-Evans y Millar, 1996; Satue-Gracia et al., 1997; Chance et al., 1979; Fridovich, 1975,1978; Halliwell 1978a,1981a; Tang et al., 2004). El daño oxidativo está asociado con el envejecimiento y numerosas enfermedades humanas (Finkel y

Holbrook, 2000; Halliwell, 1991; Halliwell y Aruoma, 1992; Halliwell y Gutteridge, 1999; Maxwell, 1995; Mujahid et al., 2007; Ross et al., 1997; Steinberg, 1991) por ejemplo: inflamación, cáncer, aterosclerosis, diabetes mellitus (Ames et al., 1995; Barthomeuf et al., 2001; Remacle y Renard, 1996), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Wilson, ataxia de Friedreich y esclerosis múltiple (Chaudhury y Saeker, 1983; Fang, 1989; Kozumbo et al., 1985; Sas et al., 2007), necrosis tubular aguda causada por numerosas fallas renales incluyendo daño por isquemia/repercusión, nefrotoxicidad por sustancias químicas (Baud y Ardaillou, 1986; Nath et al., 1996; Shah y Walker, 1992; Walker y Shah, 1987; Weinberg, 1991) e insuficiencia renal aguda (IRA, Ueda et al., 1995).

Para diferenciar entre efectos fisiológicos y patológicos es necesario identificar y cuantificar las ERO y ERN.

1.4. DETERMINACIÓN DE ERO Y ERN

Los ensayos que proveen evidencia indirecta de actividad de ERO y ERN incluyen: cambios en los niveles de antioxidantes endógenos o aumento en los marcadores bioquímicos de daño oxidativo o nitrosativo, por ejemplo niveles de ácido tiobarbitúrico o marcadores de oxidación de proteínas y lípidos. Se pueden obtener evidencias indirectas de síntesis de óxido nítrico (NO) por medición de citrulina (un producto de la síntesis de NO de L-arginina), por medición de la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) en tejidos homogenizados, y por medición de moléculas que actúan como segundos mensajeros para NO, por ejemplo, GMPc. Se han obtenido evidencias indirectas de los efectos de ERO en la función muscular probando los efectos de enzimas anti-ERO (superóxido dismutasa y catalasa) y antioxidantes no específicos (donadores de grupo tiol, trampas de spin, nutrientes antioxidantes, etc.). Sin embargo, ninguno puede ser utilizado para determinar la producción biológica de ERO y ERN.

Las ERO y ERN endógenas son difíciles de medir en sistemas biológicos porque son producidos en pequeñas cantidades y porque son relativamente inestables. *in vivo*, las ERO y ERN son degradadas rápidamente por interacción con antioxidantes endógenos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión) y componentes celulares que incluyen

residuos de tiol, oxígeno molecular, metaloproteínas y otras ERO y ERN. En la tabla 2 se muestran los ensayos que se han utilizado para la determinación de ambas especies:

Tabla 2. Ensayos usados para determinar ERO y ERN

Ensayo	ERO y ERN detectadas	Tipo de muestra	Referencia
RSE (Resonancia spin electrónico)	Radicales libres	Músculo de conejo Tibial anterior de rana Extremidad posterior de rata Gastrocnemio de ratón Gastrocnemio de rata Recto abdominal de humano	Commoner et al. 1954 Koren et al. 1983 Davies et al. 1982 Jackson et al. 1985
Citocromo C	$O_2^{\bullet-}$ / NO	Diafragma de rata Diafragma de rata Diafragma de rata Diafragma de rata Diafragma de rata	Borzzone et al. 1994 Reid et al. 1992a Kobzik et al. 1994 Andrade et al. 1996 Kolbeck et al. 1997
DCFH (2',7'-diclorodihidrofluoresceína)	ERO / ERN	Diafragma de rata Diafragma de rata Vasto lateral de rata Tibial anterior de conejo Células endoteliales Estrés en sangre total Fagocitos Fagocitos Macrófagos de microglia de rata Estrés oxidativo en neutrófilos	Reid et al. 1992b Murrant et al. 1999 Bemja y Ji 1999 Best et al. 1999 Royall e Ischiropoulos 1993 Trinkle et al. 1987 Rothe y Valet 1990 Rothe et al. 1991 Banati et al. 1991 Smith y Weidemann 1993

		Estallido respiratorio en granulocitos Condrocitos articulares de conejo	Vowells et al. 1995 Tiku et al. 1990
Salicilato (Hidroxilación aromática)	$\bullet\text{OH}$ / ONOO	Diafragma de rata Sóleo de rata Gastrocnemio de rata Sóleo de rata Gastrocnemio de rata	Díaz et al. 1993 Ohkuwa et al. 1997 Itoh et al. 1998
Quimioluminiscencia	NO	Extensor digital lateral de rata Sóleo de ratón Diafragma de ratón	Balon y Nadler 1994 Hirschfield 2000
L-fenilalanina	$\bullet\text{OH}$ / ONOO	Tríceps sural de gato Vasto lateral de rata	O'Neill et al. 1996 Leeuwenburgh et al. 1998
Nitración de tirosina	$\bullet\text{OH}$ / ONOO	Vasto lateral de rata	Leeuwenburgh et al. 1998
Sensor porfirínico	NO	Aductor mayor de conejo	Huck et al. 1997
Lucigenina	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Aductor mayor de conejo	Huck et al. 1997
Hidroetidina	$\text{O}_2^{\bullet-}$ / ONOO	Diafragma de rata	Nethery et al. 1999
Método de Richmond	$\bullet\text{OH}$	<i>in vitro</i> <i>in vitro</i> <i>in vitro</i> (PMN) Jugo de cosecha de bayas Jugo de fresa	Richmond et al. 1981 Floyd et al. 1984 Sagone et al. 1993 Wang y Jiao 2000 Wang y Zheng 2001
Reacción con titanio	$\bullet\text{OH}$	Extractos de plantas	Patterson et al. 1984
Método de Elstner y Heupel	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Jugo de cosecha de bayas Jugo de fresa	Wang y Jiao 2000 Wang y Zheng 2001
NBT (nitroazul de tetrazolio)	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Solución con polímero de <i>Symphytum asperum</i>	Barthomeuf et al. 2001

		Sulindac, sulfato de sulindac o sulfona de sulindac S-alilcisteína (SAC)	Fernandes et al. 2003 Medina-Campos et al. 2007
FOX (hierro 3+/naranja de xilenol)	H ₂ O ₂	Hidroperoxidos en fase acuosa y lipídica Bebidas (te y café) S-alilcisteína (SAC)	Wolff 1994 Lee y Halliwell 2001 Medina-Campos et al. 2007
Ácido Tiobarbitúrico (TBA)	•OH	Solución con polímero de <i>Symphytum asperum</i> Sulindac, sulfato de sulindac o sulfona de sulindac	Barthomeuf et al. 2001 Fernandes et al. 2003
DMNA (<i>N,N</i> -dimetil-4-nitroso-anilina)	¹ O ₂	Cloroplastos Jugo de cosecha de bayas Jugo de fresa S-alilcisteína (SAC)	Chakraborty y Tripathy 1992 Wang y Jiao 2000 Wang y Zheng 2001 Medina-Campos et al. 2007

Los ensayos para detectar ERO y ERN deben tener características específicas. 1) El sistema de ensayo debe ser suficientemente reactivo para competir con las enzimas y otros blancos intracelulares; 2) Para detectar la mayoría de las especies reactivas, el sistema de ensayo debería tener acceso al espacio intracelular donde la reactividad y la carga tienden a concentrar ERO y ERN endógenos cerca de los sitios de síntesis; 3) La cuantificación de ERO y ERN requiere que el ensayo pueda ser calibrado; 4) Para identificar especies moleculares específicas, el ensayo debe tener un alto grado de especificidad, ensayos sin especificidad pueden usarse para estimar la producción total de ERO y ERN (Murrant y Reid, 2001).

1.5. ANTIOXIDANTES

Existen 2 grandes sistemas de defensa contra el estrés oxidativo: a) enzimáticos: SOD, catalasa, peroxidasa, peroxirredoxina y algunas enzimas de apoyo; b) no enzimáticos: como los antioxidantes de bajo peso molecular que actúan indirectamente (por ejemplo los agentes quelantes) y los que actúan directamente (por ejemplo glutatión y agentes exógenos de las fuentes dietéticas: ácido ascórbico, ácido lipoico, polifenoles y carotenoides) (Barthomeuf et al., 2001; Gilgun et al., 2001; Sies, 1993). Sin embargo, estos mecanismos protectores no son particularmente eficaces.

2. CROMO

El cromo (Cr) es el sexto elemento más abundante de la tierra y sólo se encuentra en combinación con otros elementos. Los compuestos de cromo son utilizados principalmente en 3 tipos de industrias: química, metalúrgica y de material refractario (material resistente al calor). En dichas industrias es donde ocurre la exposición ocupacional a estos compuestos. Los estados de oxidación más estables del cromo son 3+ y 6+, siendo la forma trivalente más estable que el cromo hexavalente. La toxicidad de los compuestos de cromo depende de su estado de oxidación. En promedio la dosis letal del cromo hexavalente es de 1-3 g, en cambio, el cromo trivalente es relativamente no tóxico. El cromo hexavalente es un oxidante muy fuerte, especialmente en medio ácido (Barceloux, 1999). Dependiendo de la vía por la que ingrese al cuerpo, el cromo hexavalente puede ocasionar sensibilidad en la piel, el pulmón, irritación generalizada de la conjuntiva y mucosas membranales, perforaciones nasales y dermatitis. En cambio, el cromo trivalente es un elemento traza necesario para la formación del factor de tolerancia a la glucosa y para el metabolismo de la insulina (Bencko, 1985).

2.1. DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$)

El dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) es un compuesto de origen sintético y su primer uso fue como pigmento (amarillo y naranja). Actualmente 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 fósforos, terminados de metales y producción de pigmentos. En la industria metalúrgica se utiliza en la fabricación de acero inoxidable, de

hierro colado y de aleaciones ferrosas. Este compuesto, por su alto punto de fusión y resistencia al ácido, es ideal para la fabricación de material refractario. La mayor exposición a este compuesto ocurre durante la preparación de ferrocromo, pigmentos de cromo, platinados de cromo y soldadura de acero inoxidable (Barceloux, 1999).

El $K_2Cr_2O_7$ es muy soluble en agua y en solución se disocia en iones potasio y dicromato (K^+ y $Cr_2O_7^{2-}$), en medio básico se favorece la formación de anión cromato (CrO_4^{2-}). Sin embargo, en ambos iones el estado de oxidación del cromo es 6+. En condiciones fisiológicas, se favorece la formación del ión cromato (CrO_4^{2-}). La vida media del Cr(VI) en plasma es de 39 h (De Flora y Wetterhahn, 1989) y entra a las células por acción de un sistema de transporte aniónico para fosfatos y sulfatos (Dartsch et al., 1998; Jennette, 1981). Se acumula principalmente en hígado y riñón, siendo afectada la función de ambos (Laborda et al., 1986). En el riñón provoca insuficiencia renal aguda (Pedraza-Chaverri et al., 1995b; Seiken et al., 1994) y necrosis tubular aguda (NTA) (Dartsch et al., 1998; Ellis et al., 1982; Franchini et al., 1978; Liu y Shi, 2001; Pedraza-Chaverri et al., 1995b; Tandon et al., 1979; Wedeen y Qian, 1991, Barrera et al., 2003a).

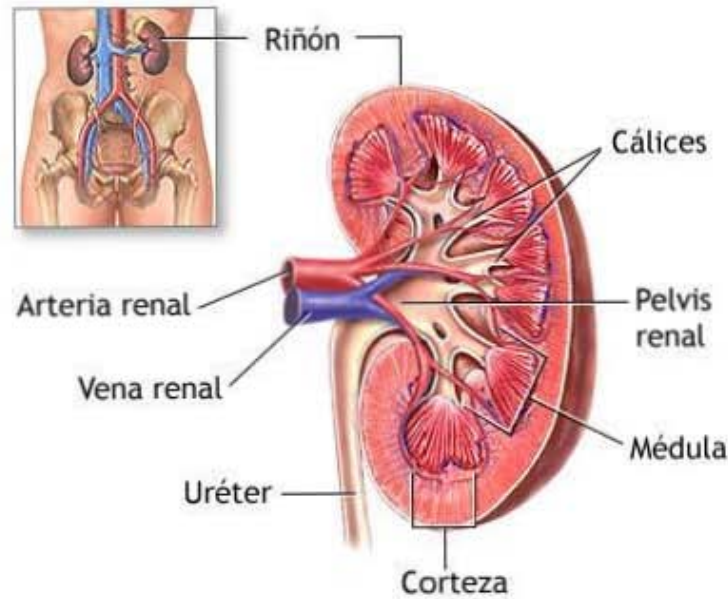
3. RIÑÓN

El riñón es un órgano par, localizados justo arriba de la cintura entre el peritoneo y la parte posterior del abdomen (Esquema 1). En el humano adulto, un riñón normal mide de 10 a 12 cm de largo, de 5 a 7 cm de ancho y 3 cm de espesor; tiene una masa de 135 a 150 g.

Un corte frontal a través del riñón revela dos regiones distintas: corteza renal y médula renal. La corteza renal y pirámides de la médula renal constituyen la porción funcional o parénquima del riñón (Esquema 1). En éste se encuentran cerca de un millón de estructuras microscópicas llamadas nefronas (unidades funcionales del riñón).

3.1. NEFRONA

Las nefronas se encargan de filtrar la sangre, retornar a la sangre las sustancias útiles para que no se pierdan del cuerpo y retirar de la sangre sustancias que no son necesarias para el organismo. Mantienen la homeostasis de la sangre y producen orina (Tortora et al., 2006).



Esquema 1. Sección frontal del riñón izquierdo mostrando sus principales características anatómicas.

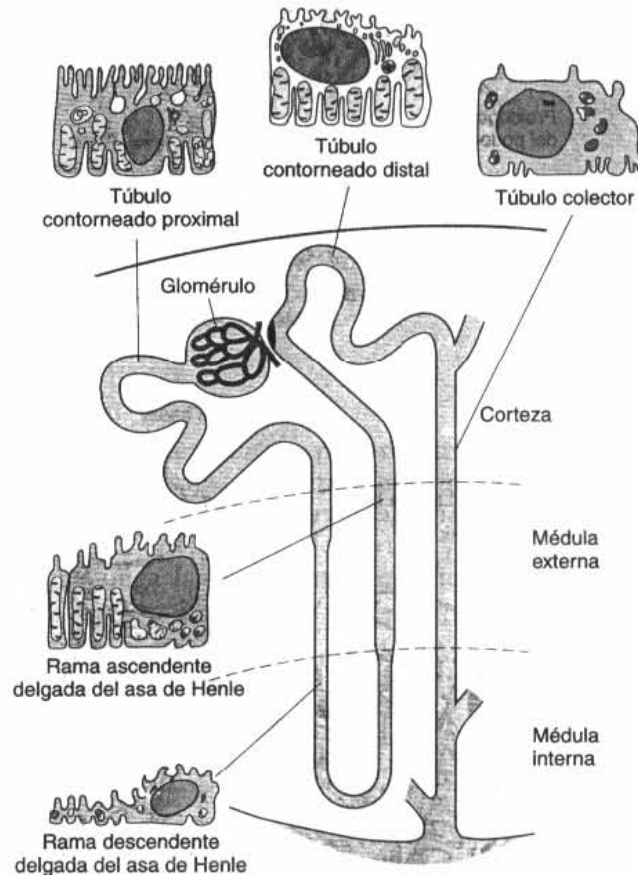
La nefrona se conforma del glomérulo y del túbulo. En el túbulo se pueden apreciar diferentes secciones. Las nefronas cuyos glomérulos están en las porciones externas de la corteza renal presentan asas de Henle cortas (nefronas corticales) y aquellas cuyos glomérulos están en la región yuxtamedular de la corteza (nefronas yuxtamedulares) tienen asas largas que se extienden hasta las pirámides medulares. En los humanos, sólo 15% de las nefronas tiene las asas largas.

Los glomérulos miden unos 200 μm de diámetro, se forman por la invaginación de capilares hacia el extremo ciego dilatado de la nefrona (cápsula de Bowman). Hay dos capas celulares que separan la sangre del filtrado glomerular en la cápsula de Bowman: el endotelio capilar y el epitelio especializado de la cápsula que está formado por podocitos que cubren los capilares glomerulares. Existen células estrelladas llamadas células mesangiales que se localizan entre la lámina basal y el endotelio. Las células mesangiales son contráctiles y participan en la regulación de la filtración glomerular.

La membrana glomerular permite el paso libre de las sustancias neutras de hasta 4 nm de diámetro y excluye las de más de 8 nm. Las cargas de las moléculas y su diámetro afectan su paso hacia la cápsula de Bowman.

A partir de la membrana glomerular se continúa el túbulo de la nefrona. El túbulo contorneado proximal humano mide cerca de 15 mm de largo y 55 μm de diámetro. Su pared está formada por una sola capa de células en forma de cubo y ricas en mitocondrias (Pocock y Richards, 2005). Los bordes luminales de las células tienen un borde de cepillo estriado por la presencia de innumerables microvellosidades que miden $1 \times 0.7 \mu\text{m}$ (Esquema 2).

El túbulo proximal contorneado se endereza y la siguiente porción de cada nefrona es el asa de Henle. La porción descendente del asa y la porción proximal del miembro ascendente están hechas de células delgadas, permeables. La porción gruesa del túbulo ascendente está conformada de células gruesas que contienen muchas mitocondrias (Esquema 2).



Esquema 2. Nefrona yuxtamedular. Principales características histológicas de las células que constituyen cada porción de túbulo.

La rama ascendente gruesa del asa de Henle llega al glomérulo de la nefrona, del cual surgió el túbulo, y pasa cerca de sus arteriolas. El túbulo contorneado distal, mide cerca de 5 mm de largo. Su epitelio es más bajo que el del túbulo proximal y, aunque tiene unas cuantas microvellosidades, no hay un borde de cepillo distintivo (Esquema 2). Los túbulos distales confluyen para formar túbulos colectores que miden 20 mm de largo y pasan por la corteza y médula renal para vaciarse en la pelvis renal en los vértices de las pirámides medulares (Ganong, 2006).

3.1.1. Importancia del túbulo proximal

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

Además de su actividad reabsorbente, las células del túbulo proximal secretan activamente diversas sustancias al interior de la luz tubular. Elimina numerosos metabolitos de la sangre, incluyendo sales biliares, creatina, hipuratos, prostaglandinas y urato, así como diversas sustancias incluyendo fármacos (Pocock y Richards, 2005). Esta gran actividad de las células del túbulo proximal las hacen susceptibles al daño por diversos tóxicos.

3.2. NEFROPATIAS

Las nefropatías se encuentran entre las causas más importantes de muerte e incapacidad en muchos países de todo el mundo. En los últimos años aparecen entre las 6 primeras causas de morbilidad hospitalaria y como la décima causa de muerte en el país (INEGI/SSA).

3.2.1. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

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

1. IRA como resultado de un menor aporte sanguíneo renal; este trastorno a menudo se denomina IRA prerrenal para reflejar el hecho de que la anomalía se produce en

un sistema previo a los riñones. Esto puede ser la consecuencia de una insuficiencia cardíaca con un menor gasto cardíaco y una presión arterial baja o de trastornos asociados a un menor volumen sanguíneo y a una presión arterial baja, como una hemorragia grave.

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

3.2.1.1. Insuficiencia renal aguda intrarrenal

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

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

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

Algunas causas de IRA intrarrenal son:

Lesión de vasos pequeños o glomerular

- Vasculitis (poliarteritis nudosa)
- Émbolos de colesterol
- Hipertensión maligna
- Glomerulonefritis aguda

Lesión epitelial tubular (necrosis tubular)

- Necrosis tubular aguda debida a isquemia
- Necrosis tubular aguda debida a toxinas (metales pesados, etilenglicol, insecticidas, intoxicación por setas, tetracloruro de carbono)

Lesión intersticial renal

- Pielonefritis aguda
- Nefritis intersticial alérgica aguda

3.2.2. INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA (IRC)

La IRC se desarrolla cuando la IRA no se repara a tiempo y se han perdido más de tres cuartas partes del tejido renal funcional. Como consecuencia, la tasa de filtración glomerular (TFG) disminuye sustancialmente y la concentración de orina en sangre aumenta (uremia). El deterioro de la función tubular hace fracasar la regulación iónica normal, origina acidosis y acumulación de metabolitos. A menos que se apliquen medidas correctivas, la acumulación de metabolitos (en especial metabolitos nitrogenados derivados del catabolismo de las proteínas) y la alteración del equilibrio iónico normal desembocan en una depresión del SNC, el coma y, en último término, la muerte (Pocock y Richards, 2005).

II. INTRODUCCIÓN

Sharma y col. (1978) demostraron que el $K_2Cr_2O_7$ es capaz de provocar, además de necrosis tubular, hemólisis intravascular, la cual puede acelerar el proceso de necrosis y entonces agravar la insuficiencia renal. Se ha reportado que el $K_2Cr_2O_7$ administrado a ratas (en dosis únicas de 20 mg/kg) provoca alteraciones en el riñón, afectando particularmente a las células del túbulo proximal (Ruegg et al., 1987) provocando en ellas la pérdida de la membrana de borde de cepillo. Pedraza-Chaverrí y col. (1995b) y Barrera y col. (2003a,b) determinaron que las células epiteliales del túbulo proximal de ratas tratadas con 15 mg/kg de $K_2Cr_2O_7$ presentan un aumento en el número de vacuolas y lisosomas.

En presencia de glutatión peroxidasa y NADPH, el Cr (VI) se reduce a Cr (V) generando $\bullet OH$ (Shi y Dalal, 1989; Xie y Zhuang, 2001). Otros estudios indican que el Cr (VI) puede interaccionar con grupos tioles, por ejemplo el del glutatión (Appenroth et al., 1996a; Hojo y Satomi, 1991; O'Brien et al., 1985; Pourahmad y O'Brien, 2001; Sugiyama, 1992) produciendo *in vitro* Cr (V), el cual es capaz de reducir al oxígeno molecular generando $O_2^{\bullet -}$ (O'Brien y Kortenkamp, 1994). El $O_2^{\bullet -}$ a su vez es reducido por la superóxido dismutasa, o bien genera H_2O_2 por dismutación, el cual al reaccionar con el Cr (V) mediante la reacción de Fenton produce la ruptura de la molécula generándose $\bullet OH$ (Aiyar et al., 1990; Jones et al., 1991; Liu y Shi, 2001). Algunos estudios *in vitro* sugieren que además de $\bullet OH$ se puede generar 1O_2 con la participación de algunas moléculas de agua (Kawanishi et al., 1986; Sugden y Stearns, 2000).

Xie y Zhuang (2001) observaron que en cultivos de células de pulmón de hámster chino, la generación de $\bullet OH$ en células tratadas con Cr (VI) está involucrado en el daño de la membrana plasmática y de los organelos, lo que ocasiona su disfunción.

Las ERO participan en la fisiopatología de la IRA experimental, como en la isquemia-reperfusión (Nath y Norby, 2000; Pedraza-Chaverri et al., 1992,2000; Rodrigo y Rivera, 2002; Ueda et al., 2001). La IRA inducida por $K_2Cr_2O_7$ se ha usado como modelo de estudio para la fisiopatología de esta enfermedad (Barrera et al., 2003a,b; Pedraza-Chaverrí et al., 1995b; Seiken et al., 1994).

III. HIPÓTESIS

Considerando que el estrés oxidativo se presenta durante la insuficiencia renal aguda por $K_2Cr_2O_7$ entonces es posible medir algunas ERO (peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo y singulete de oxígeno) generadas por exposición de las células de túbulo proximal al tóxico.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar las ERO: peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo y singulete de oxígeno; en la toxicidad por exposición a $K_2Cr_2O_7$ en células de epiteliales de túbulo proximal de cerdo (LLC-PK1).

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer los tiempos de estudio del modelo de toxicidad por exposición a $K_2Cr_2O_7$ en células LLC-PK1, determinar la viabilidad, la cantidad de proteína en cada tiempo y el daño celular.

Establecer las condiciones experimentales para realizar la determinación de peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo y singulete de oxígeno en células LLC-PK1.

Medir los niveles de peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo y singulete de oxígeno en células LLC-PK1 expuestas o no a $K_2Cr_2O_7$.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

La histidina, el ácido ascórbico, el naranja de xilenol, el hidroxitolueno butilado, la *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina (DMNA), el nitroazul de tetrazolio (NBT), el carbonato de sodio (Na_2CO_3), el sulfato ferroso amoniacal hexahidratado ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), la desoxirribosa, el tetrametoxipropano (TMPO), el ácido tiobarbitúrico y la deferoxamina mesilato (DFO) fueron de la marca Sigma-Aldrich. El dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido tricloroacético, el metanol grado HPLC, el H_2SO_4 , el fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), el fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) fueron de la marca JT Baker. El fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) fue de la marca Mallinckrodt.

Las células epiteliales de túbulo proximal renal de cerdo (LLC-PK1) fueron de American Type Culture Collection (ATCC). El Medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), la tripsina (25%), el suero fetal bovino (SFB), el antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 0.10 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B) fueron de la marca GIBCO.

2. Cultivo de células

Las células LLC-PK1 se cultivaron en DMEM suplementado con SFB al 10% (DMEM/SFB 10%) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de O_2 con 5% de CO_2 en una incubadora RM130005-9-ABA (Revco Termo Electrón Corporation). Se subcultivaron dos veces por semana antes que alcanzaran el 80% de confluencia. Para ello, se trabajó en un área estéril generada en un gabinete de seguridad biológica Clase II Tipo A2 (Nuairé). En dicho gabinete se retiró el medio a las células y se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.5. Se adicionó 1 ml de tripsina y se incubó durante 3 min a 37°C. Se tomó la tripsina junto con las células y se depositó en un tubo estéril de 15 ml. Se hizo un lavado a la caja, adicionó 1 ml de DMEM/SFB 10% y el medio se depositó en el tubo. Las células se centrifugaron a 1,000 rpm durante 3 min, en una centrífuga EBA20 (Hettich); se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 5 ml de DMEM/SFB 10% para resuspender las células.

Para el crecimiento de las células se adicionó el DMEM/SFB 10% suficiente para distribuir las células en el número de cajas deseado. Cuando se sembraron cajas para experimento, las células se contaron en una cámara de Neubauer. Posteriormente, se sembraron cajas de 96 pozos, con 20,000 células en 70 μ l de DMEM/SFB 10% por pozo. Cuando se alcanzó la confluencia (usualmente 24 h después), se eliminó el medio y se adicionaron 70 μ l de solución de tratamiento.

3. Modelo de estudio

Se utilizó el modelo de toxicidad por dicromato de potasio en células LLC-PK1. Recientemente en el laboratorio donde se realizó esta tesis se caracterizó dicha toxicidad. Se utilizó la concentración efectiva 50 (CE_{50}) a 24 h (40 μ M).

Las células sembradas en cajas de 96 pozos se organizaron en dos grupos: control (CT) y $K_2Cr_2O_7$ (DCR). Se les eliminó el medio y se les adicionó DMEM/SFB 1% al grupo CT ó $K_2Cr_2O_7$ 40 μ M en DMEM/SFB 1% al grupo DCR. Se incubaron por 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, ó 24 h. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se tomaron fotografías representativas de cada grupo y tiempo. Posteriormente, se retiró el medio y sólo se conservaron 20 μ l para su uso posterior. Las células se lavaron con el correspondiente amortiguador. A continuación, dependiendo del parámetro a medir: a) se realizaron las determinaciones de viabilidad o cantidad de proteína; b) se les adicionaron 10 ó 20 μ l del amortiguador de fosfatos (AF) de acuerdo a la determinación y se sonicaron a 20 Khz (130 W) durante 10 segundos en un sonicador VCX130PB (Sonics & Materials). Las determinaciones de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, y 1O_2 se realizaron en las células y en sus correspondientes medios de incubación. Los experimentos se hicieron por triplicado o cuadruplicado y se repitieron en 3 diferentes ocasiones.

4. Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951). Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS, se les adicionaron 10 μ l de agua destilada y se sonicaron a 20 Khz (130 W) durante 10 segundos. Se preparó una curva patrón con albúmina sérica bovina (0, 5, 10, 15, 25, 35, 50 y 100 μ g/ml) y se trató a la par de las muestras. Se adicionaron 100 μ l de la solución C [A:B, 50:1 (A: tartrato de

sodio y potasio 0.02%, NaOH 0.4%, Na₂CO₃ 2%; B: CuSO₄ 0.5%)], se agitó y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después se adicionaron 10 µl de solución D (Folin:agua, 1:1), se agitó en vortex G-560 (Scientific Industries) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbencia se determinó a 660 nm. La curva se utilizó para calcular la concentración de cada muestra analizada. Los resultados se expresaron como µg de proteína.

5. Ensayo de viabilidad

La viabilidad celular se midió mediante el método de cristal violeta. Las células muertas pierden su capacidad de mantenerse adheridas a la caja de cultivo (Flick y Gifford, 1984) y mediante el lavado son eliminadas. El cristal violeta se une inespecíficamente a las proteínas, por tanto hay una relación directa entre la cantidad de proteína determinada por el colorante y el número de células vivas presentes.

Después del tratamiento, las células se lavaron con 50 µl de PBS para remover las células muertas (células no adheridas). Las células que permanecieron adheridas (células vivas) se fijaron con 50 µl de glutaraldehído 1.1% (v/v) y después de 15 min éste se eliminó. Se adicionaron 50 µl de cristal violeta 0.5% y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Después se retiró el cristal violeta y las células se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de ácido acético al 10% y se determinó la absorbencia a 595 nm. La viabilidad se expresó como porcentaje respecto al control.

6. Determinación de anión superóxido (O₂^{•-})

En esta determinación, se empleó el método de reducción del NBT. En este ensayo el NBT es reducido por el O₂^{•-} y se convierte a formazán de NBT que absorbe a 560 nm (Bielski y Shlue, 1980). Las sales de tetrazolio son indicadores coloridos muy sensibles a reacciones enzimáticas redox.

Se utilizó como blanco la mezcla de reacción (NBT 0.075 mM y carbonato de sodio 32 mM en AF 50 mM pH 7). A 20 µl de muestra en AF 50 mM pH 7 ó medio de incubación,

se adicionaron 80 μl de la mezcla de reacción. Se agitó en vortex e inmediatamente se midió la absorbencia cada minuto a 560 durante 3 min en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman). Se obtuvo el promedio de las diferencias por minuto, se calculó la concentración de $\text{O}_2^{\bullet-}$ utilizando el coeficiente de absortividad molar ($25\,400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y para las muestras de células se ajustó por μg de proteína.

7. Determinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Esta determinación se realizó siguiendo el método de FOX. Este método se basa la oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}) por el H_2O_2 a la forma férrica (Fe^{3+}). La cual forma un complejo con el naranja de xilenol cuya absorción máxima se presenta a los 560 nm (Jiang et al., 1992; Lee & Halliwell, 2001; Nourooz-Zadeh & Wolf, 1994; Nourooz-Zadeh et al., 1995).

Se preparó una curva de 0, 10, 25, 50 y 75 μM de H_2O_2 . A 10 μl de la curva o de la muestra o del medio de incubación, se les adicionó 1 μl de metanol y se agitó en vortex. Luego se adicionaron 100 μl del reactivo de FOX (9 volúmenes de hidroxitolueno butilado 4 mM en MeOH y 1 volumen de naranja de xilenol 1 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 2.56 mM en H_2SO_4 250 mM) y se agitó en vortex. La curva y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Se determinó la absorbencia de la curva y de las muestras a 560 nm. Con los datos de la curva se calculó la concentración de H_2O_2 en cada muestra y para las muestras de células se ajustó por μg de proteína.

8. Determinación de radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$)

Para la determinación de $\bullet\text{OH}$ se utilizó el método indirecto del ácido tiobarbitúrico. El cual está basado en la conversión de desoxirribosa a malondialdehído por acción del $\bullet\text{OH}$. Posteriormente el malondialdehído reacciona con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido, formando un aducto de color rosa (Halliwell et al., 1987).

A 20 μl de la muestra o del medio de incubación se adicionaron 80 μl de la mezcla de reacción (ácido ascórbico 0.25 mM y desoxirribosa 0.65 mM en AFK 20 mM pH 7.4). Se agitó en vortex y se incubó durante 1 h a 37°C. Cinco minutos antes de cumplirse la hora

de incubación se preparó una curva estándar con tetrametoxipropano de 0, 0.74, 1.48, 2.96, 5.92, 11.84 y 23.68 μM , que equivalen respectivamente a 0, 0.74, 1.48, 2.96, 5.92, 11.84, 23.68 nmol de malondialdehído. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 100 μl de la mezcla de TBA (TBA 25.32 mM, HCl 0.636 M, TCA 1.487 M y DFO 1 mM) a la curva y a las muestras, y se agitaron en vortex. Se colocaron en un baño a ebullición durante 10 min. Se midió la absorbencia a 532 nm. Con los datos obtenidos de la curva se calculó la concentración de $\cdot\text{OH}$ en la muestra y para las muestras de células se ajustó por μg de proteína.

9. Determinación de singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

Esta determinación se basa en el método espectrofométrico que describen Chakraborty y Tripathy (1992) y Joshi y Pathak (1984). En el cual el $^1\text{O}_2$ reacciona con la DMNA y la histidina con la DMNA oxidada.

Se utilizó como blanco agua destilada. A 20 μl de la muestra o del medio de incubación se adicionaron 100 μl de una solución de histidina 11 mM en AF 60 mM pH 7.1 y 8 μl de DMNA 1 mM. Se agitó en vortex y se midió la absorbencia a 440 nm. Se incubó a 37°C durante 40 min y se volvió a leer a 440 nm. Se preparó una curva de DMNA (0, 48.8, 97.7, 146.5, 195.3, 244.1, 293, 341.8, 390.6, 349.4 y 488.3 μM) y se leyó a 440 nm. Se obtuvo la diferencia de absorbencia y utilizando la curva de DMNA, se calculó la concentración de $^1\text{O}_2$ y para las muestras de células se ajustó por μg de proteína.

VII. RESULTADOS

Las células incubadas con dicromato de potasio se monitorearon cada 3 h, durante 24 h. Se determinó la viabilidad celular (Fig. 1A), la cantidad de proteína (Fig. 1B) y se tomaron fotografías representativas de cada tiempo estudiado (Fig. 2).

La viabilidad celular y la cantidad de proteína se comportaron de forma similar, se observaron diferencias entre los grupos CT y DCR ($P < 0.0001$, análisis del tratamiento por

de incubación se preparó una curva estándar con tetrametoxipropano de 0, 0.74, 1.48, 2.96, 5.92, 11.84 y 23.68 μM , que equivalen respectivamente a 0, 0.74, 1.48, 2.96, 5.92, 11.84, 23.68 nmol de malondialdehído. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 100 μl de la mezcla de TBA (TBA 25.32 mM, HCl 0.636 M, TCA 1.487 M y DFO 1 mM) a la curva y a las muestras, y se agitaron en vortex. Se colocaron en un baño a ebullición durante 10 min. Se midió la absorbencia a 532 nm. Con los datos obtenidos de la curva se calculó la concentración de $\cdot\text{OH}$ en la muestra y para las muestras de células se ajustó por μg de proteína.

9. Determinación de singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)

Esta determinación se basa en el método espectrofométrico que describen Chakraborty y Tripathy (1992) y Joshi y Pathak (1984). En el cual el $^1\text{O}_2$ reacciona con la DMNA y la histidina con la DMNA oxidada.

Se utilizó como blanco agua destilada. A 20 μl de la muestra o del medio de incubación se adicionaron 100 μl de una solución de histidina 11 mM en AF 60 mM pH 7.1 y 8 μl de DMNA 1 mM. Se agitó en vortex y se midió la absorbencia a 440 nm. Se incubó a 37°C durante 40 min y se volvió a leer a 440 nm. Se preparó una curva de DMNA (0, 48.8, 97.7, 146.5, 195.3, 244.1, 293, 341.8, 390.6, 349.4 y 488.3 μM) y se leyó a 440 nm. Se obtuvo la diferencia de absorbencia y utilizando la curva de DMNA, se calculó la concentración de $^1\text{O}_2$ y para las muestras de células se ajustó por μg de proteína.

VII. RESULTADOS

Las células incubadas con dicromato de potasio se monitorearon cada 3 h, durante 24 h. Se determinó la viabilidad celular (Fig. 1A), la cantidad de proteína (Fig. 1B) y se tomaron fotografías representativas de cada tiempo estudiado (Fig. 2).

La viabilidad celular y la cantidad de proteína se comportaron de forma similar, se observaron diferencias entre los grupos CT y DCR ($P < 0.0001$, análisis del tratamiento por

ANOVA 2 vías) y cambiaron a través del tiempo ($P < 0.0001$, análisis del tiempo por ANOVA 2 vías). Del inicio del estudio hasta las 12 h, no se observaron diferencias. A partir de las 15 h, el grupo de DCR empezó a disminuir su viabilidad y la cantidad de proteína ($P < 0.05$ ó $P < 0.001$ pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo) (Fig. 1).

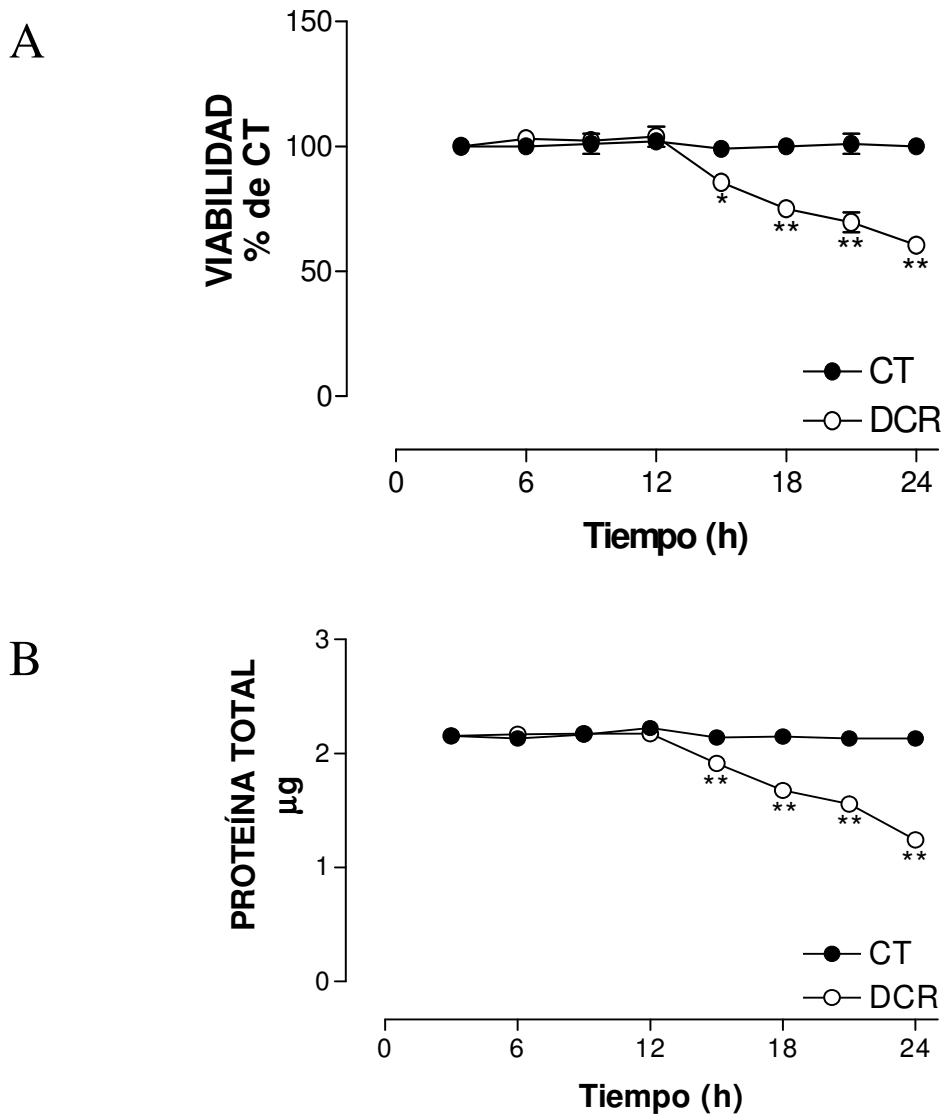


Figura 1. Determinación de viabilidad celular (A) y proteína total (B). Prom±E.E.M. n=3. CT – grupo control, DCR – grupo de $K_2Cr_2O_7$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo. (A) $P < 0.0001$ (tratamiento), $P < 0.0001$ (tiempo), ANOVA de 2 vías. (B) $P < 0.0001$ (tratamiento), $P < 0.0001$ (tiempo), ANOVA de 2 vías.

Ver última página de este archivo (35)

Las fotografías tomadas en el microscopio invertido mostraron a las células del grupo CT normales. En el grupo de DCR se observaron células muertas y células en proceso de morir. Las células muertas eran aquellas que no estaban pegadas y por tanto se observaban redondas y por encima de la monocapa. Las células que estaban en proceso de morir, iban perdiendo su forma normal y se estaban despegando. A medida que el tiempo de exposición al $K_2Cr_2O_7$ aumentaba, también aumentaban las células muertas y en proceso de morir en el grupo DCR (Fig. 2).

Se determinaron cuatro especies reactivas, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$ y 1O_2 . Los métodos previamente reportados se adaptaron para medir las ERO en células cultivadas.

El $O_2^{\bullet-}$ se midió con el método de reducción de NBT. La cantidad de $O_2^{\bullet-}$ aumentó en las células y en el medio de incubación a lo largo del tiempo ($P < 0.0001$, análisis del tiempo por ANOVA 2 vías) en ambos grupos ($P < 0.0001$, análisis del tratamiento por ANOVA 2 vías), siendo mayor en el grupo de DCR (Fig. 3A). Además en el medio de incubación se observó una diferencia aún mayor en el grupo de DCR respecto al CT, a las 18 y 21 h ($P < 0.05$ pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo) (Fig. 3B).

El H_2O_2 se midió con el método de FOX. En las células se encontró que hubo diferencias a lo largo del tiempo ($P < 0.0001$, análisis del tiempo por ANOVA 2 vías). Además se observó una diferencia entre el grupo DCR y el CT a las 18 h (** $P < 0.001$, pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo) (Fig. 4A). En el medio de incubación se observaron diferencias entre los grupos DCR y CT ($P < 0.0001$, análisis del tratamiento por ANOVA 2 vías), a través del tiempo ($P = 0.0236$, análisis del tiempo por ANOVA 2 vías) y en todos los tiempos estudiados ($P < 0.001$ pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo) (Fig. 4B).

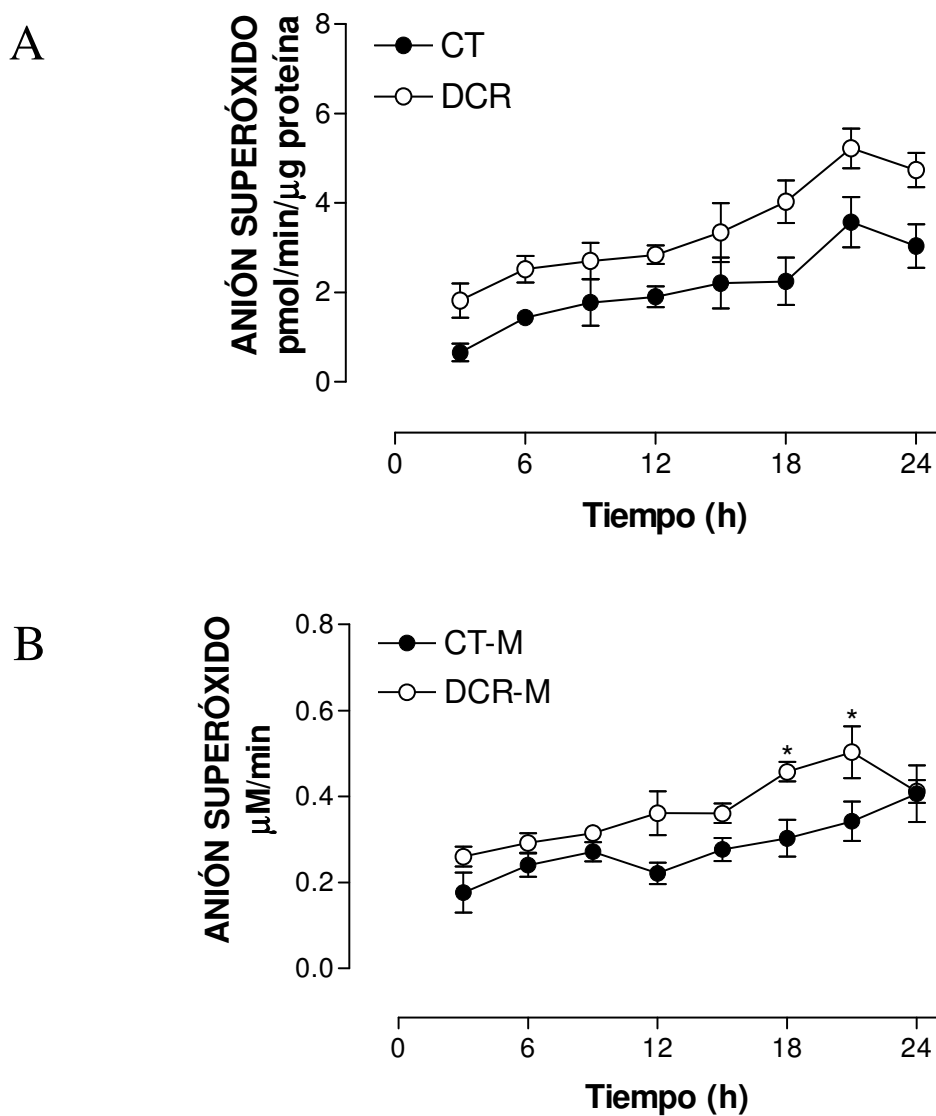


Figura 3. Determinación de anión superóxido en células (A) y en medio de incubación (B). Prom±E.E.M. n=3. CT – grupo control, DCR – grupo de $K_2Cr_2O_7$. *P<0.05 pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo. (A) P<0.0001 (tratamiento), P<0.0001 (tiempo), ANOVA de 2 vías. (B) P<0.0001 (tratamiento), P<0.0001 (tiempo), ANOVA de 2 vías.

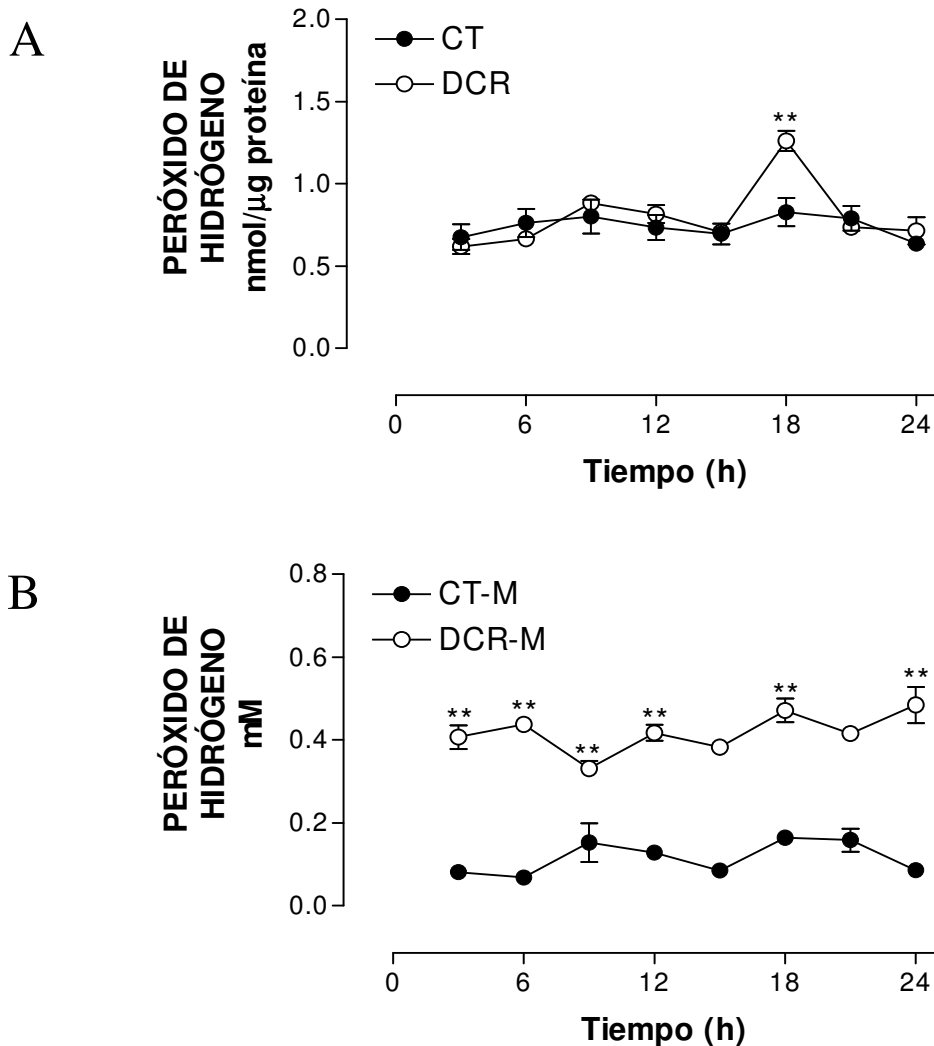


Figura 4. Determinación de peróxido de hidrógeno en células (A) y en medio de incubación (B). Prom±E.E.M. n=3. CT – grupo control, DCR – grupo de $K_2Cr_2O_7$. ** $P<0.001$ pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo. (A) $P=0.1423$ (tratamiento), $P<0.0001$ (tiempo), ANOVA de 2 vías. (B) $P<0.0001$ (tratamiento), $P=0.0236$ (tiempo), ANOVA de 2 vías.

El $\bullet OH$ se midió con el método de ácido tiobarbitúrico. La cantidad de $\bullet OH$ producido por las células y en el medio de incubación presentó un comportamiento semejante. Los grupos CT y CDR fueron diferentes ($P=0.0324$ y $P=0.0254$, análisis del tratamiento por ANOVA 2 vías). Además cambiaron a través del tiempo en cada grupo ($P<0.0001$ y $P=0.0362$, análisis del tiempo por ANOVA 2 vías). Sin embargo no se observaron diferencias entre los grupos en cada uno de los diferentes tiempos (Fig.5).

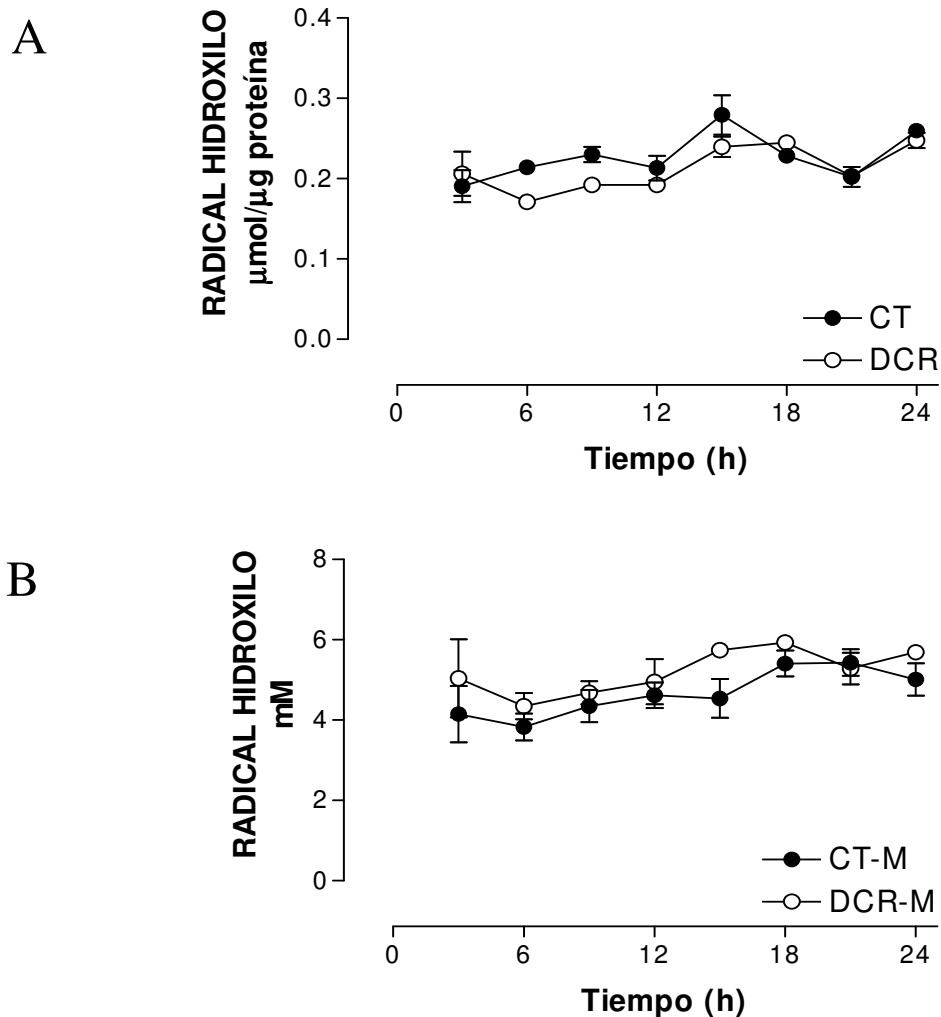


Figura 5. Determinación de radical hidroxilo en células (A) y en medio de incubación (B). Prom \pm E.E.M. n=3. CT – grupo control, DCR – grupo de $K_2Cr_2O_7$. *P<0.05 post-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo. (A) P=0.0324 (tratamiento), P<0.0001 (tiempo), ANOVA de 2 vías. (B) P=0.0254 (tratamiento), P=0.0362 (tiempo), ANOVA de 2 vías.

El 1O_2 fue determinado por el método de DMNA. La cantidad de 1O_2 determinada en las células fue diferente entre los grupos (P<0.0001, análisis del tratamiento por ANOVA 2 vías) y aumentó a través del tiempo (P<0.0001, análisis del tiempo por ANOVA 2 vías).

Siendo mucho mayor en el grupo de DCR en los tres últimos tiempos, alcanzando su máximo valor a 21 h (Fig. 6A).

En el caso de los medios de incubación tanto los grupos CT y DCR presentaron el mismo comportamiento ($P=0.9222$, análisis del tratamiento por ANOVA 2 vías). En ambos grupos la cantidad de 1O_2 aumentó a través del tiempo ($P<0.0001$, análisis del tiempo por ANOVA 2 vías) (Fig. 6B).

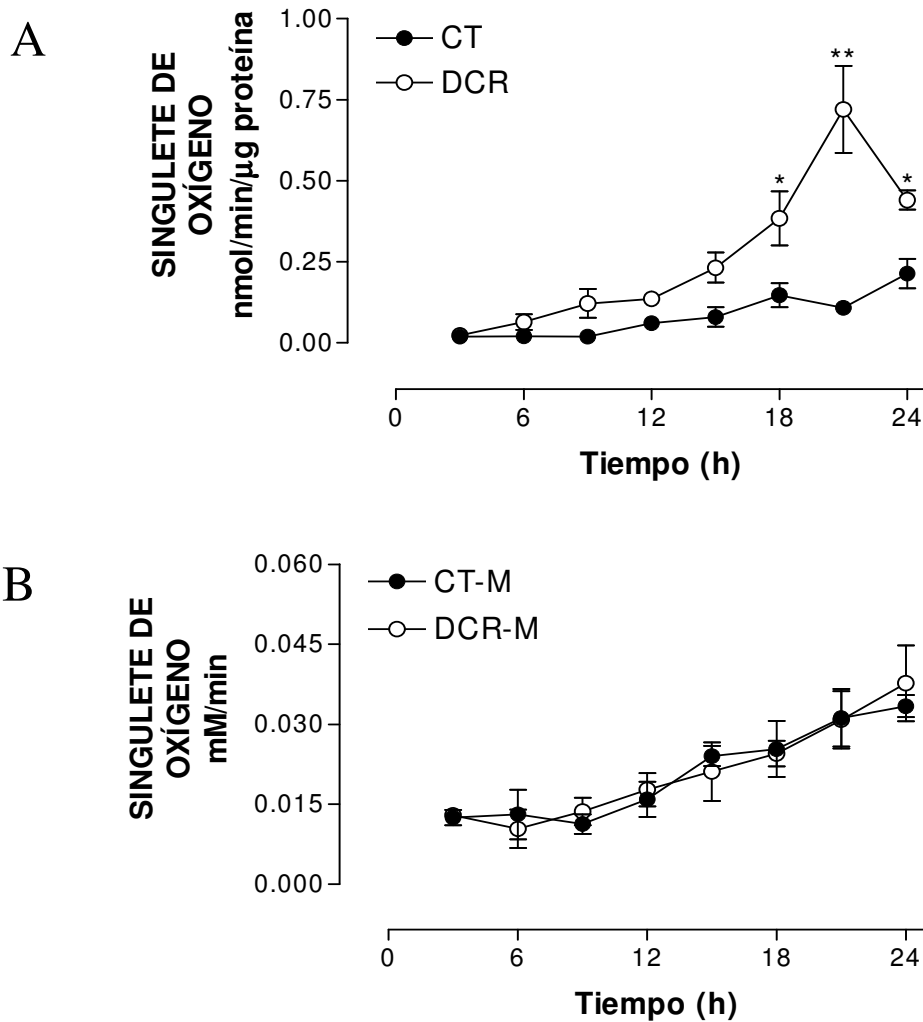


Figura 6. Determinación de singlete de oxígeno en células (A) y en medio de incubación (B). Prom \pm E.E.M. n=3. CT – grupo control, DCR – grupo de $K_2Cr_2O_7$. * $P<0.05$, ** $P<0.001$ pos-análisis de Bonferroni entre grupos de cada tiempo. (A) $P<0.0001$ (tratamiento), $P<0.0001$ (tiempo), ANOVA de 2 vías. (B) $P=0.9222$ (tratamiento), $P<0.0001$ (tiempo), ANOVA de 2 vías.

VIII. DISCUSIÓN

Todos los ensayos se realizaron en medio suplementado con SFB al 1%, con el fin de evitar la división celular habitual. No se eliminó totalmente el suero para no cambiar drásticamente las condiciones de las células.

La concentración de $K_2Cr_2O_7$ 40 μM se eligió debido a que en el modelo *in vivo* en rata, se encontró un 50% de necrosis o células muertas en el túbulo proximal (Barrera et al., 2003a,b). La viabilidad para las células tratadas con $K_2Cr_2O_7$ disminuyó conforme transcurrió el tiempo a partir de las 12 h. Al final del experimento, se observó aproximadamente el 50% de viabilidad en las células tratadas con $K_2Cr_2O_7$ 40 μM . La correspondencia de viabilidad y cantidad de proteína permite pensar que el método de cristal violeta es adecuado a pesar de no ser tan utilizado para este fin. El método de reducción de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la mitocondrias es el más utilizado para medir la viabilidad celular. Sin embargo nosotros no lo utilizamos debido a que el MTT podía ser reducido por las ERO que se generaran por el $K_2Cr_2O_7$.

Las fotografías obtenidas por el estudio temporal del efecto de la toxicidad del $K_2Cr_2O_7$ permitieron establecer que las células control no presentaron alteraciones importantes a lo largo del tratamiento. En este grupo se observaron algunas células muertas, sin embargo se consideraron dentro del proceso normal, porque el resto de las células no presentó alteraciones. En cambio las células tratadas con $K_2Cr_2O_7$ presentaron mayor número de células muertas conforme aumentó el tiempo de exposición. Además aumentó el número de células con diversas alteraciones, destacando desprendimiento y diferencia en el tamaño de las células muertas. Estas alteraciones indican muerte por toxicidad.

En las células y en los medios de incubación de las células control se pudo observar que el $\cdot OH$, 1O_2 y el $O_2^{\cdot -}$ aumentaron a través del tiempo. En cambio, el H_2O_2 cambió su concentración pero de forma oscilante. Dichas observaciones comprueban la intervención de estas ERO en procesos celulares normales. Sin embargo es posible que se requieran experimentos adicionales retirando por completo el SFB. Para comprobar si este participa en la creciente formación de ERO.

En las células y en los medios de incubación de las células tratadas con $K_2Cr_2O_7$ se observó un aumento de las 4 ERO a través del tiempo. Este comportamiento semejante en ambos grupos (control y con $K_2Cr_2O_7$) se diferenció en varios tiempos de la exposición a $K_2Cr_2O_7$. Se presentó un pico de producción de H_2O_2 a las 18 h y de 1O_2 a las 21 h, en las células expuestas a $K_2Cr_2O_7$. Además de un pico de producción de $O_2^{\bullet-}$ a las 21 h y un aumento constante de H_2O_2 en el medio de incubación que contenía $K_2Cr_2O_7$.

El hecho de que la producción de H_2O_2 sea prácticamente igual para las células en ambos grupos (control y con $K_2Cr_2O_7$) probablemente se deba a que los sistemas de defensa de la célula reaccionan con él de la misma forma. Sin embargo la producción de H_2O_2 por el $K_2Cr_2O_7$ es muy grande en el ambiente extracelular.

El aumento de ERO por la presencia de $K_2Cr_2O_7$, puede ocasionar que se presenten las alteraciones en la célula, causándole la muerte. Por otro lado podría ser que el daño celular ocasionado por el $K_2Cr_2O_7$, genere el estrés oxidativo.

A pesar de que existen varios métodos para determinar ERO y ERN la mayoría no es específica, es decir, detectan ERO o ERN en general y en algunos casos la determinación envuelve a más de una especie. Aquellos métodos que son semi-específicos muchas veces no se pueden practicar en muestras biológicas debido a la inestabilidad de las especies reactivas y/o al medio. En muchas ocasiones las especies reactivas reaccionan con todo lo que encuentran a su paso y en otras, los sistemas antioxidantes de la célula las eliminan antes de poder medirlas.

En el caso particular de la determinación de $O_2^{\bullet-}$ mediante la reducción de NBT es importante mencionar que existen únicamente reportes de la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de diversos productos (Barthomeuf et al., 2001; Fernandes et al., 2003; Medina-Campos et al., 2007). En el presente estudio, se realizó una adaptación para medir el $O_2^{\bullet-}$ en la línea celular LLC-PK1 (un sistema biológico *in vitro*). A pesar de que el NBT puede reaccionar con componentes celulares la presencia del grupo control permite suponer el aumento del $O_2^{\bullet-}$. También, cabe destacar que los resultados obtenidos son reproducibles.

La determinación de H_2O_2 por el método de FOX se utiliza ampliamente y se pueden realizar modificaciones de acuerdo a la muestra objeto de estudio. Las muestras deben medirse inmediatamente después que termina su tiempo de incubación. Es muy importante preparar el reactivo de FOX como se indica pues de otra manera no hay reacción.

El experimento indicó que la determinación de $\bullet OH$ por el método de TBA se puede realizar en el sistema biológico *in vitro* propuesto en el presente estudio. Anteriormente este método sólo se había utilizado para determinar la capacidad antioxidante de algunos compuestos (Barthomeuf et al., 2001; Fernandes et al., 2003). Existen reportes de la determinación del $\bullet OH$ en diferentes músculos pero por otros métodos (Díaz et al., 1993; Ohkuwa et al., 1997; O'Neill et al., 1996; Leeuwenburgh et al., 1998). En este método debe cuidarse que la temperatura de incubación, se mantenga constante durante los 10 min.

El método de DMNA para la determinación de 1O_2 también se puede realizar en nuestro sistema biológico *in vitro*. Este método se había utilizado antes pero en cloroplastos (Chakraborty y Tripathy, 1992) y para evaluar la capacidad antioxidante de jugos de bayas (Wang y Jiao, 2000; Wang y Zheng, 2001) y SAC (Medina-Campos et al., 2007). En este método sólo debe cuidarse el tiempo de incubación pues la reacción es continua.

Es muy importante tener en cuenta que los lavados de las células no se deben hacer con PBS. Observamos que éste influía en los resultados, aumentaba las lecturas y la variabilidad de los datos. Es posible que se deba a la presencia del cloruro de sodio en el PBS, en específico del cloro (Cl) el cual es muy reactivo.

Determinar ERO en un sistema biológico *in vitro* es importante ya que la mayoría de las determinaciones de ERO se realizan con la finalidad de ver si un compuesto tiene propiedades antioxidantes y para ello se utiliza un sistema artificial productor de la especie reactiva en específico. Los métodos utilizados en este estudio son sencillos y únicamente requieren un espectrofotómetro.

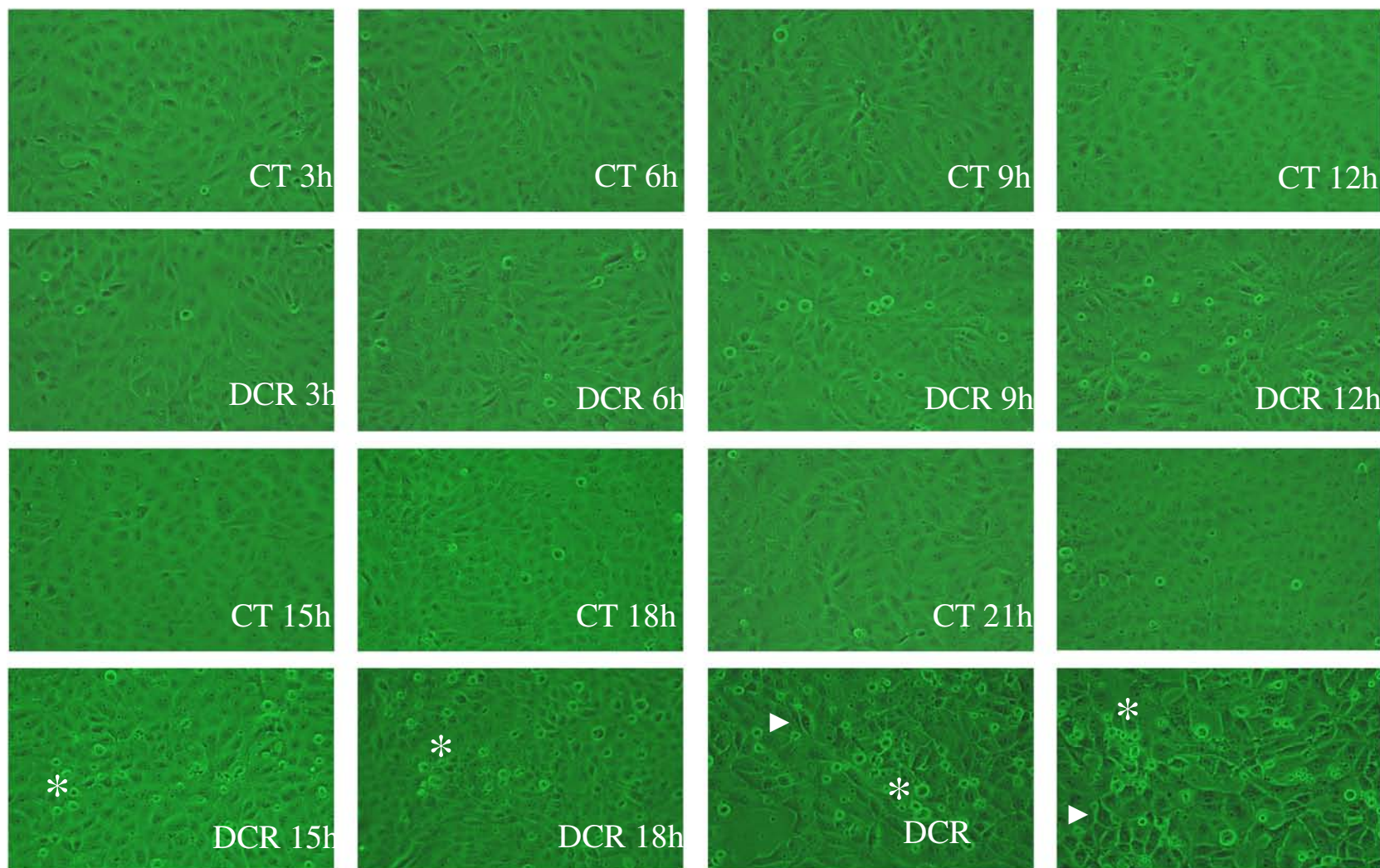


Figura 2. Estudio temporal del efecto de la toxicidad del $K_2Cr_2O_7$. CT – grupo control, DCR – grupo de $K_2Cr_2O_7$. 200 X. Células muertas (*) y células que se están despegando (▶).

IX. CONCLUSIONES

1. Se adaptaron las condiciones para la determinación de las ERO: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, y 1O_2 en una línea celular.
2. Se determinó la presencia de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, y 1O_2 generadas por la exposición a $K_2Cr_2O_7$ en las células LLC-PK1.
3. Los resultados de esta tesis permiten suponer que el daño celular se origina por el H_2O_2 que se genera en el medio con $K_2Cr_2O_7$, dando como resultado un aumento de células muertas.

X. BIBLIOGRAFIA

Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. 1990. Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: Reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chem Res Toxicol* 3: 595-603.

Ames BN, Shingenage MK, Hagen TM. 1995. Oxidants, antioxidants diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.

Andrade FH, Moody MR, Stamler JS, Reid MB. 1996. Cytochrome c reduction assay detects nitric oxide release by rat diaphragm. En: Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs EA, editors. *The biology of nitric oxide*. London: Portland Press, p 45.

Appenroth D, Rost M, Friedrich M, Schulz O. 1996a. Contribution to the mechanism of chromate nephrotoxicity in developing rats: EPR investigations. *Arch Toxicol* 71: 25-30.

Apple FS, Hyde JE, Ingersoll-Stroubos AM, Theologides A. 1991. Geographic distribution of xanthine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle. *Am J Anat* 192: 319-323.

Babbs CF, Cregor MD, Turek JJ, Badylak SF. 1991. Endothelial superoxide production in buffer perfused rat lungs, demonstrated by a new histochemical technique. *Lab Invest* 65: 484-496.

Balon TW, Nadler JL. 1994. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* 77: 2519-2521.

Banati RB, Rothe G, Valet G, Kreutzberg GW. 1991. Respiratory burst activity in brain macrophages: A flow cytometric study on cultured rat microglia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17: 223-230.

IX. CONCLUSIONES

1. Se adaptaron las condiciones para la determinación de las ERO: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, y 1O_2 en una línea celular.
2. Se determinó la presencia de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, y 1O_2 generadas por la exposición a $K_2Cr_2O_7$ en las células LLC-PK1.
3. Los resultados de esta tesis permiten suponer que el daño celular se origina por el H_2O_2 que se genera en el medio con $K_2Cr_2O_7$, dando como resultado un aumento de células muertas.

X. BIBLIOGRAFIA

Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. 1990. Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: Reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chem Res Toxicol* 3: 595-603.

Ames BN, Shingenage MK, Hagen TM. 1995. Oxidants, antioxidants diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.

Andrade FH, Moody MR, Stamler JS, Reid MB. 1996. Cytochrome c reduction assay detects nitric oxide release by rat diaphragm. En: Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs EA, editors. *The biology of nitric oxide*. London: Portland Press, p 45.

Appenroth D, Rost M, Friedrich M, Schulz O. 1996a. Contribution to the mechanism of chromate nephrotoxicity in developing rats: EPR investigations. *Arch Toxicol* 71: 25-30.

Apple FS, Hyde JE, Ingersoll-Stroubos AM, Theologides A. 1991. Geographic distribution of xanthine oxidase, free radical scavengers, creatine kinase and lactate dehydrogenase enzyme systems in rat heart and skeletal muscle. *Am J Anat* 192: 319-323.

Babbs CF, Cregor MD, Turek JJ, Badylak SF. 1991. Endothelial superoxide production in buffer perfused rat lungs, demonstrated by a new histochemical technique. *Lab Invest* 65: 484-496.

Balon TW, Nadler JL. 1994. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* 77: 2519-2521.

Banati RB, Rothe G, Valet G, Kreutzberg GW. 1991. Respiratory burst activity in brain macrophages: A flow cytometric study on cultured rat microglia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17: 223-230.

- Barceloux DG. 1999. Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol* 37: 173-194.
- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003a. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by $K_2Cr_2O_7$. *Free Radical Biology and Medicine* 34: 1390-1398.
- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. 2003b. Protective effect of $SnCl_2$ on $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity in rats: the indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzymes. *Life Sci* 73: 3027-3041.
- Barthomeuf CM, Debiton E, Barbakadze VV, Kemertelidze EP. 2001. Evaluation of the dietetic and therapeutic potential of a high molecular weight hydroxycinnamate-derived polymer from *Symphytum asperum* Lepech. Regarding its antioxidant, antilipoperoxidant, antiinflammatory, and cytotoxic properties. *J Agric Food Chem* 49: 3942-3946.
- Baud L, Ardaillou R. 1986. Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am J Physiol* 251: F765-F776.
- Beauchamp C, Fridovich I. 1970. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245: 4641-4646.
- Bejma J, Ji LL. 1999. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 87: 465-470.
- Bencko V. 1985. Chromium: a review environmental and occupational toxicology. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 29: 37-46.
- Best TM, Fieberg R, Corr DT, Brickson S, Ji LL. 1999. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *J Appl Physiol* 87: 74-82.
- Bielski BHJ, Shlue GG, Bajuk S. 1980. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2 and $O_2^{\bullet-}$ radicals. *J Phys Chem* 84: 830-833.
- Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF. 2000. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* 71: 129-134.
- Borzzone G, Zhao B, Merola AJ, Berliner L, Clanton TL. 1994. Detection of free radicals by electron spin resonance in rat diaphragm after resistive loading. *J Appl Physiol* 77: 812-818.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630.
- Buettner GR. 1993. The pecking order of the free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300: 535-543.

- Cadenas E, Davies KJ. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29: 222-230.
- Chakraborty N, Tripathy BC. 1992. Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic damage of cucumber (*Cucumis sativus*) chloroplasts. *Plant Physiol* 98: 7-11.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- Charpie JR, Webb RC. 1993. Vascular myocyte-derived nitric oxide is an autocrine that limits vasoconstriction. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 763-768.
- Chaudhury S, Sarker PK. 1983. Stimulation of tubulin synthesis by thyroid hormone in the developing rat brain. *Biochem Biophys Acta* 763: 93-98.
- Commoner B, Townsend J, Pake GE. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689-691.
- Corey EJ, Mehrota MM, Khan AU. 1987. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 842-846.
- Crane FL, Sun IL, Clark MG, Grebing C, Low H. 1985. Transplasma-membrane redox systems in growth and development. *Biochim Biophys Acta* 811: 233-264.
- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ. 1986. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3811-3813.
- Dartsch PC, Hildbrand S, Kimmel R, Schmahi FW. 1998. Investigations on the nephrotoxicity and hepatotoxicity of trivalent and hexavalent chromium compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 71: S40-S45.
- Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-1205.
- Deby C, Goutier R. 1990. New perspective on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. *Biochem Pharmacol* 39: 399-405.
- De Flora S, Wetterhahn KE. 1989. Mechanism de chromium (VI) metabolism and genotoxicity. *Life Chem Rep* 7: 169-244.
- Diaz PT, She Z, Davis WB, Clanton TL. 1993. Hydroxylation of salicylate by the in vitro diaphragm: evidence for hydroxyl radical production during fatigue. *J Appl Physiol* 75: 540-545.
- Dinger B, He L, Chen J, Liu X, Gonzalez C, Obeso A, Sanders K, Hoidal J, Stensaas L, Fidone S. 2007. The role of NADPH oxidase in carotid body arterial chemoreceptors. *Respir Physiol Neurobiol* 157: 45-54.

- Dizdaroglu M. 1990 Gas chromatography-mass spectrometry of free radical-induced products of pyrimidines and purines in DNA. *Methods Enzymol* 193: 841-857.
- Duncan CJ, Rudge MF. 1988. Are lysosomal enzymes involved in rapid damage in vertebrate muscles? A study of the separate pathways leading to cellular damage. *Cell Tissue Res* 253: 447-455.
- Ellis EN, Brouhard BH, Lynch RE, Dawson EB, Tisdell R, Nichols MM, Ramirez F. 1982. Effects of hemodialysis and dimercaprol in acute dichromate poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 19: 249-258.
- Elstner EF, Heupel A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: A simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem* 70: 616-620.
- Elstner EF. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 73-82.
- Fang RZ. 1989. *Radical and Enzyme*, Science Press, Beijing, p. 153.
- Fernandes E, Toste SA, Lima JLFC, Reis S. 2003. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 35: 1008-1017.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Flick DA, Gifford GE. 1984. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68: 167-175.
- Floyd RA, Watson JJ, Wong PK. 1984. Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing high pressure liquid chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *J Biochem Biophys Methods* 10: 221-235.
- Franchini I, Mutti A, Cavatorta A, Corradi A, Cosi A, Olivetti G, Borghetti A. 1978. Nephrotoxicity of chromium. Remarks on an experimental and epidemiological investigation. *Contrib Nephrol* 10: 98-110.
- Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
- Freeman BD. 1984. Biological sites and mechanisms of free radical production. En: *Free radicals molecular biology, aging, and disease*. Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slater TE. (eds). Raven, New York, pp 43-52.
- Fridovich I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44: 147-159.
- Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases. *Science* 201: 875-880.
- Fridovich. I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264: 7761-7764.

- Ganong, William F. 2006. *Fisiología Médica*; 20ª edición; El Manual Moderno.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. 2001. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40: 957-961.
- Gonzalez C, Agapito MT, Rocher A, Gonzalez-Martin MC, Vega-Agapito V, Gomez-Niño A, Rigual R, Castañeda J, Obeso A. 2007. Chemoreception in the context of the general biology of ROS *Respir Physiol Neurobiol* 157: 30-44.
- Guyton AC, Hall EJ. 2006. *Tratado de Fisiología Médica*; 11ª edición; Elsevier; España.
- Halliwell B. 1978a. Sonographic demonstration of intrauterine contraceptive devices. *Cell Biol Int Rep* 2: 113-128.
- Halliwell B. 1978b. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett* 92: 321-326.
- Halliwell B. 1978c. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system. *FEBS Lett* 96: 238-242.
- Halliwell, B. 1981a in *Age Pigments* (Sohal, RS, ed.), pp. 1-62, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- Halliwell, B. 1991. The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species. In *Free radicals and food additives*; Aruoma OI, Halliwell B, Eds.; Taylor & Francis Inc: PA, pp 41-45.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 251: 9-19.
- Halliwell B, Aruoma OI. 1992. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanism, and measurement using chromatographic methods. En *Molecular biology of free radical scavenging systems*; Scandalios JG, Ed. CSHL: New York, pp 23-27, 47-58.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 8: 89-193.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246: 501-514.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165: 215-219.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update FEBS Lett 307: 108-112.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed, Oxford University Press, New York.

Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. J Agric Food Chem 46: 4107-4112.

Hirschfield W, Moody MR, O'Brein WE, Gregg AR, Bryan RM, Reid MB. 2000. Nitric oxide release and contractile properties of skeletal muscle from mice deficient in type III NOS. Am J Physiol 278: R95-R100.

Hojo Y, Satomi Y. 1991. In vitro nephrotoxicity induced in mice by chromium (V). Boil Trace Element Res 31: 21-31.

Huberman A. 1995. Biología de los radicales de oxígeno En: Bioquímica. Diaz ZJC, Hicks GJJ (eds). Interamericana-McGraw-Hill, México DF.

Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punz A, Mueller M, Afkampour K, Mittlboeck M, Losert U, Polterauer P, Roth E, Patton S, Malinski T. 1997. L-Arginine treatment alters kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. Circ Res 96: 667-675.

Itoh H, Ohkuwa T, Yamamoto T, Sato Y, Miymura M, Naoi M. 1998. Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. Life Sci 63: 1921-1929.

Jackson MJ, Edwards RHT, Symons MCR. 1985. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. Biochem Biophys Acta 847: 185-190.

Jennette KW. 1981. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. Environ Health Perspect 40: 233-252.

Jiang Z-Y, Hunt JV, Wolff SP. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of the xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. Anal Biochem 202: 384-389.

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.

Joshi PC, Pathak MA. 1984. The role of active oxygen (1O_2 and $O_2^{\bullet -}$) induced by crude coal tar and its ingredients used in photochemotherapy of skin diseases. J Invest Dermatol 82: 67-73.

Kawanishi S, Inoue S, Sano S. 1986. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. J Biol Chem 261: 5952-5958.

- Khan AU, Kasha M. 1994. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12365-12367.
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. 1994. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546-548.
- Kolbeck RC, She Z, Callahan LA, Nosek TM. 1997. Increased superoxide production during fatigue in the perfused rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 140-145.
- Koren A, Sauber C, Sentjurc M, Schara M. 1983. Free radicals in tetanic activity of isolated skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol* 74B: 633-635.
- Kozumbo WJ, Trush MA, Kensler TW. 1985. Are free radicals involved in tumor promotion? *Chem Biol Interact* 54: 199-207.
- Laborda R, Diaz-Mayans J, Núñez A. 1986. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of chromium compounds in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 36: 332-336.
- Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ. 1990. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes and exercise training. *J Appl Physiol* 68: 2337-2344.
- Lee HL, Halliwell B. 2001. Antioxidant & prooxidant abilities of foods and beverages. *Methods Enzymol* 335: 181-190.
- Leeuwenburgh C, Hansen P, Shaish A, Holloszy JO, Heinecke JW. 1998. Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. *Am J Physiol* 274: R453-R461.
- Liu KJ, Shi X. 2001. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222: 41-47.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Far AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Marin J, Rodriguez-Martinez MA. 1995. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol* 15: 279-307.
- Maxwell SRJ. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49: 345-361.
- McCord JM, Day ED. 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett* 86: 139-142.
- McCutchan HJ, Schwappach JR, Enquist EG, Walden DL, Terada LS, Reiss OK, Leff JA, Repine JE. 1990. Xanthine oxidase-derived H₂O₂ contributes to reperfusion injury of ischemia skeletal muscle. *Am J Physiol* 258: H1415-H1419.
- Medina-Campos ON, Barrera D, Segoviano-Murillo S, Rocha D, Maldonado PD, Mendoza-Patiño N, Pedraza-Chaverri J. 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen

and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem Toxicol* 45: 2030-2039.

Mitchell D, Tyml K. 1996. Nitric oxide release in rat skeletal muscle capillary. *Am J Physiol* 270: H1696-H1703.

Mohazzab-H KM, Wolin MS. 1994. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 267: L815-L822.

Mujahid A, Akiba Y, Warden CH, Toyomizu M. 2007. Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens *FEBS Lett* 581: 3461-3467.

Murrant CL, Andrade FH, Reid MB. 1999. Exogenous reactive oxygen and nitric oxide alter intracellular oxidant status of skeletal muscle fibers. *Acta Physiol Scand* 166: 111-121.

Murrant CL, Reid MB. 2001. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 55: 236-248.

Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. 1996. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int* 50: 1032-1043.

Nath KA, Norby SM. 2000. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 109: 665-678.

Nethery D, Stofan D, Callahan L, DiMarco A, Supinski G. 1999. Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA2 dependent. *J Appl Physiol* 87: 792-800.

Nourooz-Zadeh J, Wolff SP. 1994. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 220: 403-409.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmandi J, Birlouez-Aragon I, Wolff SP. 1995. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay *J Agric Food Chem* 43: 17-21.

O'Brien P, Barreto J, Swanson F. 1985. Chromium (V) can be generated in the reduction of chromium (VI) by glutathione. *Inorg Chim Acta* 108: 19-20.

O'Brien P, Kortenkamp A. 1994. Chemical models important in understanding the way in which chromate can damage DNA. *Environ Health Perspect* 102: 3-10.

Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M. 1997. Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiol Scand* 159: 237-244.

Okabe E, Kato Y, Kohno H, Hess ML, Ito H. 1985. Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of the effect of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem Pharmacol* 34: 961-968.

- Olinescu R, Smith T. 2002. Free radicals in medicine. Nova Science Publishers. USA. pp 11-34
- O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, Longhurst JC. 1996. Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol* 81: 1197-1206.
- Panus PC, Radi R, Chumley PH, Lillard RH, Freeman BA. 1993. Detection of H₂O₂ release from vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 14: 217-223.
- Patterson, B. D.; MacRae, E. A.; Ferguson, I. B. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem* 139: 487-492.
- Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Bobadilla N. 1992. Ischemia-reperfusion induced acute renal failure in the rat is ameliorated by the spin-trapping agent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Ren Fail* 14: 467-471.
- Pedraza-Chaverri J, Moreno-Muñiz SI, Cruz C, Hernandez-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.
- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi I, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. 2000. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 29: 602-611
- Pocock G, Richards CD. 2005. *Fisiología Humana la Base de la Medicina*; 2ª edición, Masson.
- Pourahmad J, O'Brien PJ. 2001. Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Adv Exp Med Biol* 500: 203-207.
- Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. 1992a. Reactive oxygen in skeletal muscle II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol* 73: 1805-1809.
- Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. 1992b. Reactive oxygen in skeletal muscle I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 73: 1797-1804.
- Remacle J, Renard P. 1996. Role of oxidative stress in aging. *Path Biol* 44: 65-76.
- Riberia J, Marsal J, Casasovas A, Hukkanen M, Tarabal O, Esquerda JE. 1998. Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51: 90-102.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-795.
- Richmond R, Halliwell B, Chauhan J, Darbre A. 1981. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal Biochem* 118: 328-330.

- Roberfroid M, Calderon PB. 1995. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker, Inc. USA.
- Rodrigo R, Rivera G. 2002. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radicals and Biology Medicine* 33: 409-422.
- Rosen GM, Freeman BA. 1984. Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 81: 7269-7273.
- Ross EA, Koo LC, Moberly JB. 1997. Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 30: 489-94.
- Rothe G, Valet G. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukocyte Biol* 47: 440-448.
- Rothe G, Emmendorffer A, Oser A, Roesler J, Valet G. 1991. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 138: 133-135.
- Royall JA, Ischiropoulos H. 1993. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: 348-355.
- Ruegg HE, Gandolfi AJ, Nagle RB, Brendel K. 1987. Differential patterns of injury to the proximal tube of renal cortical slices following in vitro exposure to mercury chloride, potassium dichromate, or hypoxic conditions. *Toxicol Appl Pharmacol* 90: 261-273.
- Sagone AL, Husney RM, Davis B. 1993. Biotransformation of para-aminobenzoic acid and salicylic acid by PMN. *Free Radic Biol Med* 14: 27-35.
- Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders *J Neurol Sci* 257: 221-239.
- Satue-Gracia MT, Heinonen IM, Frankel EN. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J Agric Food Chem* 45: 3362-3367.
- Seiken G, Grillo FG, Schaudies RP, Johnson JP. 1994. Modulation of renal EGF in dichromate-induced acute renal failure treated with thyroid hormone. *Kidney Int* 45: 1622-1627.
- Shah SV, Walker PD. 1992. Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure. *Ren Fail* 14: 363-370.
- Sharma BK, Singhal PC, Chugh KS. 1978. Intravascular haemolysis and acute renal failure following potassium dichromate poisoning. *Postgrad Med J* 54: 414-415.

Shi X, 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.

Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219.

Smith JA, Weidemann MJ. 1993. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 162: 261-268.

Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TL, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Paintadosi CA. 1997. Blood flow regulation by S-nitrosohaemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037.

Steenken S. 1989. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chem Res* 89: 503-520.

Steinberg, D. 1991. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation* 84: 1420-1425.

Sugden KD, Stearns DM. 2000. The role of chromium (V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19: 215-230.

Sugiyama M. 1992. Role of physiological antioxidants in chromium (VI)-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med.* 2: 397-407.

Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K, Yamaya K. 1996. Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 81: 1213-1222.

Tandon SK, Behari JR, Kachru DN. 1979. Distribution of chromium in poisoned rats. *Toxicol* 13: 28-34.

Tang Bo, Zhang Li, Hua Ji-Xi, Li Ping, Zhang Hui, Zhao Yan-Xiu. 2004. Indirect determination of superoxide anion radical in the plant of red sage based on vanillin-8-aminoquinoline with fluorescence. *Anal Chim Acta* 502: 125-131.

Tiku ML, Liesch JB, Robertson FM. 1990. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes: Enhancement by cytokines. *J Immunol* 145: 690-696.

Tortora GJ, Reynolds GS. 2006. *Principios de Anatomía y Fisiología*; 9ª edición; Oxford University Press, México.

Trinkle LS, Wellhausen SR, McLeish KR. 1987. A simultaneous flow cytometric measurement of neutrophil phagocytosis and oxidative burst in whole blood. *Diag Clin Immunol* 5: 62-68.

Ueda N, Walker P, Shah SV. 1995. Oxidant stress in acute renal failure. In: *Acute Renal Failure: New Concepts and Therapeutic Strategies*. Edited by Goligorsky MS, Stein JH. New York: Churchill Livingstone.

- Von SC. 1987. *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis, London.
- Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. 1995. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: A comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 178: 89-97.
- Walker PD, Shah SV. 1987. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am J Physiol* 253: C495-C499.
- Wang SY, Jiao H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J Agric Food Chem* 48: 5677-5684.
- Wang SY, Zheng W. 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J Agric Food Chem* 49: 4977-4982.
- Wedeen RP, Qian L. 1991. Chromium-induced kidney disease. *Environ Health Perspect* 92: 71-74.
- Weinberg JM. 1991. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 39: 476-500.
- Wolff SP. 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* 233: 182-189.
- 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.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.