



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO DE AJO
ENVEJECIDO EN LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA
INDUCIDA POR CICLOFOSFAMIDA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARICELA GARCÍA JIMÉNEZ



MÉXICO, D.F.

2010



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 Profesora: Luz del Carmen Castellanos Román

VOCAL Profesora: Perla Carolina Castañeda López

SECRETARIO Profesora: Diana Barrera Oviedo

1° SUPLENTE Profesora: María Elena Bravo Gómez

2° SUPLENTE Profesora: Claudia Huesca Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 5, 6° piso,
Departamento de Farmacología, Torre de Investigación, Facultad de
Medicina, UNAM.

FINANCIAMIENTO: Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT
IN205310.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Diana Barrera Oviedo _____

SUSTENTANTE: Maricela García Jiménez _____

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nicandro Mendoza Patiño por su asesoría para el análisis estadístico de los datos.

A la Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez por proporcionar el extracto de ajo envejecido.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar estos años...y sentirme orgullosamente parte de ella.

DEDICATORIAS

A mi Mamá por darme una Vida llena de Amor...por ser mi confidente, mi Amiga, por los valores inculcados, por los consejos, por apoyarme, por impulsarme, por Amarme... por ser la mejor Mamá que yo pudiese tener...

A mi Padre por su ejemplo de lucha y perseverancia, por su paciencia, por su apoyo y por su Amor...

A mis hermanos por estar conmigo estos 8552 y pico días y hacer que cada uno de ellos fuera diferente... por hacerme enojar de vez en cuando, pero hacerme reír en mayores ocasiones; por aconsejarme, por regañarme, por cuidarme, por molestarme y por divertirme al molestarlos jaja!!
Simplemente Gracias por ser parte de mi Historia...los Amo.

A mis Abues, tíos y primos, por sus consejos, su apoyo y su cariño...

A A.G.G. porque hace 12 años llego a mi Vida para enseñarme lo que es un Amigo...un verdadero Amigo...

A P.J.A.M. por devolverme mi Esperanza y mi Fe...por ayudarme a conocerme, entenderme y quererme tal como soy...pero sobre todo...por estar conmigo en los mejores n+1 momentos disfuncionales de mi Vida...

A R.A.R.V. por ser parte de mis momentos de mayor alegría y los de mayor tristeza...por estar siempre conmigo, cerca o lejos...pero de alguna manera, siempre conmigo... por quererme, por cuidarme y por creer en mí, incluso más de lo que yo lo hago...

A R.L.H. por hacerme tan Feliz y permitirme hacerlo Feliz...porque al fin pude entender que todo pasa por algo...y que las cosas siempre suceden simplemente cuando deben de ser...por darle este nuevo matiz mi Vida...y venir a recordarme que hay que disfrutar el hoy como sino hubiera un mañana...*Carpe diem quam minimum credula postero...*

A la Dra. Diana Barrera Oviedo...por el apoyo, por los consejos, y por el aprendizaje que me llevo de este tiempo vivido en el laboratorio, no solo a nivel profesional sino también personal. Con cariño, respeto y admiración...

A Rocío por estar conmigo a lo largo de este proyecto y ser el mejor equipo de trabajo que haya podido tener, así como por todos los momentos gratos que vivimos juntas en el laboratorio. Así mismo, gracias Tania, Gaby, Mariel, Claudia y Oscar por hacer que mi estancia ahí fuera más que grata.

Y a todas las personas que he conocido en esta parte de mi Vida...cuya presencia me ayudó a re-descubrir la esencia de mi propio Ser... GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas

1. Introducción	1
2. Marco teórico	
2.1. Riñón	
2.1.1. Anatomía e histología	2
2.1.2. Función	5
2.2. Insuficiencia renal aguda (IRA)	6
2.2.1. Insuficiencia renal aguda intrínseca	8
2.3. Estrés oxidante	10
2.3.1. Características de las principales ERO	
2.3.1.1. Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	12
2.3.1.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	12
2.3.1.3. Radical hidroxilo (OH^{\cdot})	13
2.4. Antioxidantes en los sistemas biológicos	14
2.4.1. Sistema antioxidante enzimático	14
2.4.2. Sistema antioxidante no enzimático	16
2.5. El ajo como antioxidante dietario	17
2.5.1. Extracto de ajo envejecido (EAE)	22
2.6. Ciclofosfamida	23
3. Antecedentes	25
4. Justificación	26
5. Hipótesis	27
6. Objetivo general	27
7. Objetivos particulares	27
8. Materiales y métodos	
8.1. Reactivos	28
8.2. Fármaco y antioxidante	28
8.3. Sujetos experimentales	28

8.4. Diseño experimental	29
8.5. Muestras	31
8.6. Evaluación del daño renal	
8.6.1. Daño tubular	
8.6.1.1. Actividad de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) en orina	32
8.6.1.2. Cuantificación de proteínas en orina	33
8.6.2. Función glomerular	
8.6.2.1. Creatinina en suero (CS)	33
8.6.2.2. Depuración de creatinina (DC)	34
8.6.2.3. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)	35
8.7. Evaluación del estrés oxidante	
8.7.1. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón	
8.7.1.1. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)	36
8.7.1.2. Actividad de la enzima catalasa (CAT)	36
8.7.1.3. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)	37
8.7.2. Evaluación de un marcador de estrés oxidante	
8.7.2.1. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	38
8.8. Análisis estadístico	39
9. Resultados y discusión	39
10. Resumen de resultados	54
11. Conclusión	55
12. Referencias	56

ABREVIATURAS

BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
CF	Ciclofosfamida
CS	Creatinina en suero
CT	Grupo control
DC	Depuración de creatinina
EAE	Extracto de ajo envejecido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GPx	Glutación peroxidasa
IRA	Insuficiencia renal aguda
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidasa
PT	Proteínas totales en orina
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

1. INTRODUCCIÓN

El riñón es un órgano regulador encargado de remover del cuerpo los productos terminales del metabolismo de las células, así mismo, tiene la capacidad de regular la presión sanguínea y de retener sustancias que son esenciales para la supervivencia de los individuos.

El fracaso, falla o insuficiencia renal aguda (IRA), son términos que hacen referencia a un padecimiento caracterizado por un abrupto descenso de la función renal, que trae como consecuencia la acumulación de productos de desecho de nitrógeno en sangre, tal como el nitrógeno de urea (BUN) y la creatinina (CS). El término IRA es usado cuando el decremento ocurre relativamente rápido, durante el transcurso de días a semanas. Se trata de un problema clínico frecuente asociado con el aumento de la morbilidad y mortalidad intrahospitalaria. Sus causas son diversas y se dividen en tres categorías: pre-renal, renal y post-renal.

La Ciclofosfamida (CF) es un antineoplásico perteneciente a la familia de los fármacos alquilantes, entre los que se encuentran el Busulfan, Clorambucil y Melfalan, está indicada para el tratamiento de enfermedades tales como: el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pulmonar, micosis fungoide, mieloma múltiple, neuroblastoma y retinoblastoma; por mencionar algunas. A pesar de su gran utilidad, la CF puede ocasionar pancitopenia con leucopenia, neutropenia, anemia y/o trombocitopenia, infertilidad, cistitis hemorrágica e insuficiencia renal aguda, entre otros padecimientos.

Este proyecto tiene por objetivo evaluar si el extracto de ajo envejecido (EAE), es capaz de aminorar las disfunciones renales y el estrés oxidante inducidos por la administración de uno de los antineoplásicos de mayor uso en la actualidad.

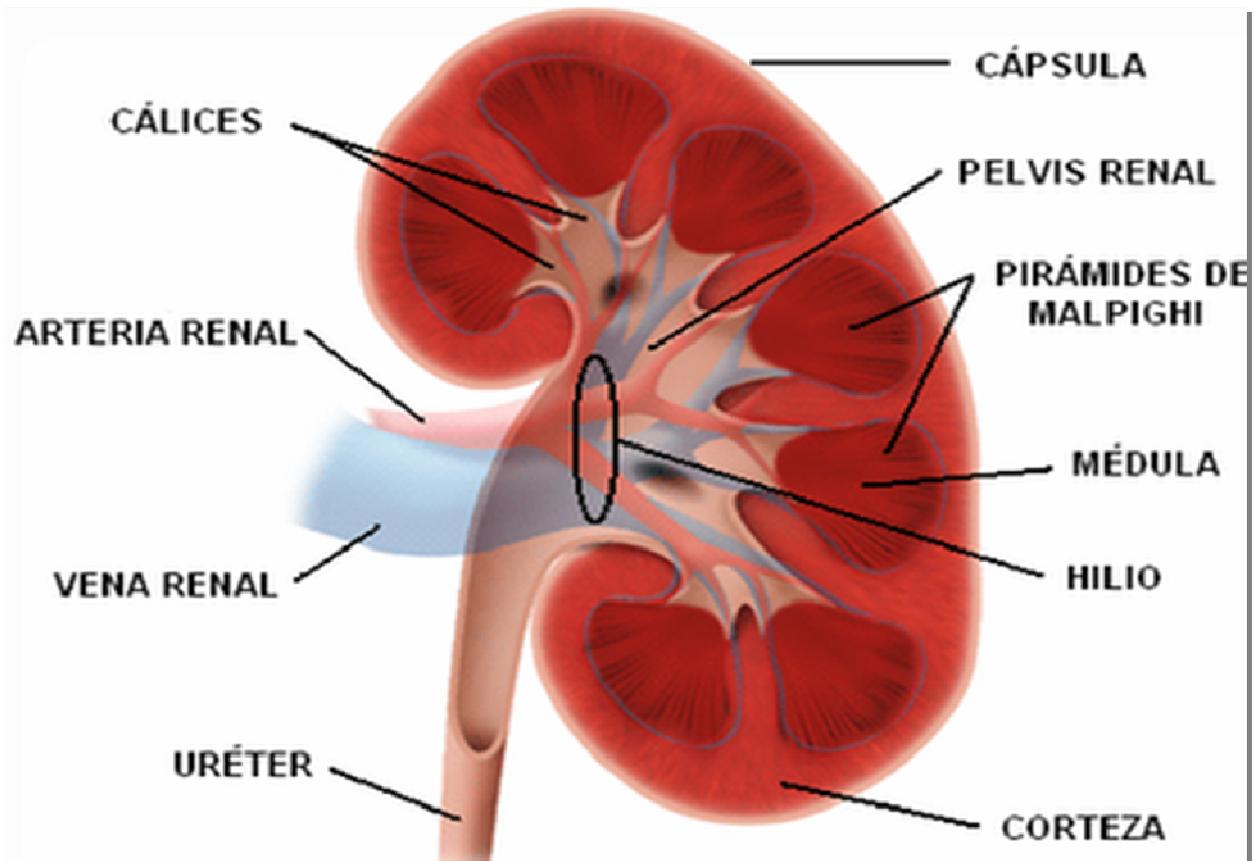
2. MARCO TEÓRICO

2.1. Riñón

2.1.1. Anatomía e histología

El riñón es un órgano par de color pardo-rojizo, ubicado detrás del peritoneo, en la cara posterior del abdomen, a ambos lados de la columna vertebral. En el ser humano, el polo superior de cada riñón se ubica a la altura de la duodécima vértebra torácica y el polo inferior se sitúa opuesto a la tercera vértebra lumbar. Habitualmente, el riñón izquierdo tiene una posición más elevada que el derecho, debido a la presencia del hígado. En el hombre adulto, el peso de cada riñón oscila entre 125 y 170 g; siendo ligeramente menor en la mujer. Mide aproximadamente 11 cm de longitud, 5 a 7.5 cm de ancho y 2.5 cm de espesor. En la cara cóncava o interna, presenta una hendidura denominada hilio, a través de la cual pasan la arteria, vena y pelvis renal. Cada riñón está tapizado por una delgada cápsula conjuntiva rica en fibras colágenas, entre las que aparecen algunas células musculares lisas.

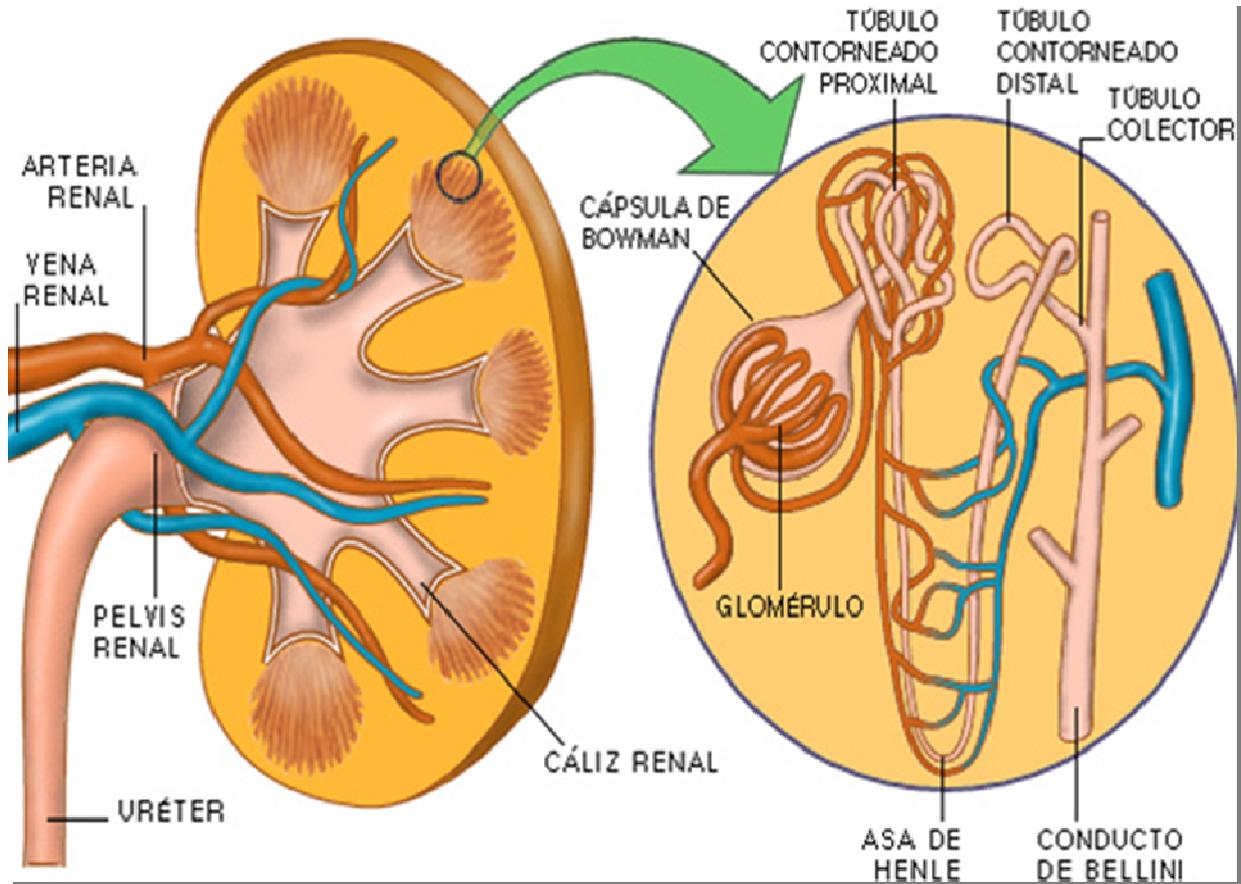
Cuando se observa el corte longitudinal de un riñón humano (Esquema 1), se pueden apreciar dos regiones distintas: una externa (la corteza), de coloración rojo-pardusca, y una interna (la médula), más pálida. En el ser humano, la médula se divide en 8 a 18 masas cónicas estriadas, las pirámides renales o de Malpighi. A diferencia del riñón humano, el de la rata y otros animales de experimentación, poseen una sola pirámide renal, por lo que se denomina "monopalilar" (**BRENNER, 2005**).



Esquema 1. Corte longitudinal de un riñón humano.

La unidad funcional del riñón es la nefrona. En un hombre adulto, existen de 1.5 a 2 millones de nefronas repartidas por toda la corteza renal, lo que contrasta con las 30,000 a 34,000 aproximadamente que hay en un riñón de rata adulta. En la nefrona se pueden distinguir dos componentes principales: el corpúsculo renal (formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman) y el sistema tubular córtico-medular. En dicho sistema se reconocen 3 subdivisiones: el túbulo proximal, el túbulo distal y el sistema colector (Esquema 2). Cada una de las citadas porciones se subdivide, a su vez, en diferentes segmentos (**HERNANDO, 2003**).

El corpúsculo renal tiene por función el llevar a cabo la filtración del plasma sanguíneo y la formación del filtrado glomerular; mientras que el sistema tubular córtico-medular concentra el filtrado hasta conseguir una orina definitiva ajustada a las necesidades homeostáticas de la sangre (BRENNER, 2005; HERNANDO, 2003).



Esquema 2. Nefrona.

Como podemos ver, el riñón es un órgano poseedor de una morfología tan compleja como bien organizada, de manera que tanto la anatomía macroscópica como su organización histológica sustentan una estructura que facilita que en los riñones se realicen ciertas funciones bioquímicas y fisiológicas importantes para la correcta homeostasis del organismo.

2.1.2. Función

La mayoría de las reacciones químicas en que se basan los procesos vitales se producen en un medio líquido, formado fundamentalmente por agua, en la que están disueltos diversas sales minerales, proteínas y otros componentes en menor cantidad. Este medio líquido está dividido en dos compartimentos, el extracelular y el intracelular.

Mediante procesos activos, el líquido intracelular se mantiene en constante intercambio con el extracelular; tanto el volumen como las propiedades fisicoquímicas del líquido extracelular deben mantenerse dentro de unos estrechos márgenes para que las células funcionen normalmente. Ciertos factores tienden a modificar el volumen y la composición del líquido extracelular. Los más importantes son la ingesta o pérdida de agua y electrolitos, así como, la adición al medio de productos de desecho del metabolismo celular.

En el organismo existe una regulación activa que se basa fundamentalmente en dos sistemas que ejercen independientemente su capacidad reguladora: el ajuste de la ingesta por parte del aparato digestivo (sed, apetito) y el ajuste de las eliminaciones por el riñón.

En este contexto, se puede afirmar que la misión fundamental del riñón es la de estabilizar el volumen y las características fisicoquímicas del líquido extracelular e indirectamente, del intracelular, mediante la formación de orina. Para ello, el riñón conserva el agua y los electrolitos presentes normalmente en los fluidos del organismo (sodio, potasio, cloruro y bicarbonato); elimina el exceso de agua, los electrolitos procedentes de la ingesta, los productos metabólicos de desecho (urea, creatinina y ácido úrico) y finalmente, los productos tóxicos que pueden haber penetrado en el

organismo. Esto se realiza mediante dos procesos fundamentales: la formación de un gran volumen de ultrafiltrado de líquido extracelular y el posterior procesamiento selectivo de este último filtrado.

Por otro lado, el riñón es capaz de segregar sustancias reguladoras como la renina (hormona que participa en el sistema renina-angiotensina-aldosterona y que contribuye al equilibrio osmótico del organismo), la eritropoyetina (hormona que actúa sobre la médula ósea estimulando la maduración y proliferación de los glóbulos rojos) y la forma activa de la vitamina D (capaz de estimular la absorción activa de calcio a nivel intestinal) **(HERNANDO, 2003)**.

2.2. Insuficiencia renal aguda (IRA)

Para el funcionamiento renal son necesarias tres premisas: perfusión sanguínea adecuada, integridad del parénquima renal y permeabilidad de las vías excretoras. La alteración súbita de cualquiera de estos elementos puede ocasionar un deterioro de la función renal denominado fracaso, fallo o insuficiencia renal aguda (IRA). La IRA es un síndrome clínico secundario a múltiples etiologías que se caracteriza por un deterioro brusco de la función renal y cuya expresión común es un aumento de la concentración de los productos nitrogenados en sangre (urea, creatinina, ácido úrico, etc.). Se trata de un problema clínico frecuente, en particular en la unidad de cuidados intensivos, donde se asocia con una mortalidad de entre el 50% y 80% **(HERNANDO, 2003; SCHRIER ET AL., 2004)**.

Dependiendo del elemento funcional alterado, la IRA se etiquetará como pre-renal si lo que falla es la perfusión renal, como parenquimatosa, intrínseca o renal, si la alteración radica en las estructuras renales y como

obstructiva o post-renal, si el flujo urinario está interrumpido (**HERNANDO, 2003**). En la tabla 1 se exponen las principales causas de la IRA.

Pre-renal	Renal, Parenquimatosa o Intrínseca	Post-renal u Obstructiva
<ul style="list-style-type: none"> • Hipovolemia. • Pérdida de sangre. • Politraumatismo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vasculitis. • Trombosis. • Hipertensión. • Glomerulonefritis. • Fármacos (antibióticos, anestésicos, antineoplásicos, inmunosupresores). • Virus, bacterias, hongos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Obstrucción de los uréteres (cálculos, coágulos). • Obstrucción vesical (hipertrofia prostática, carcinoma).

Tabla 1. Principales causas de la IRA.

La IRA se divide en tres fases:

a) Fase de iniciación u oligúrica.- El daño al parénquima renal empieza a evolucionar y puede durar horas o días. El término "oligúrica" hace referencia a la disminución del volumen en la micción (<400 mL/día). Aumento de nitrógeno de urea en sangre (BUN) y creatinina en suero (CS). Además se presenta acidosis metabólica, por la disminución en la excreción de los productos finales de los ácidos. Edemas por retención de líquidos e hiperpotasemia debido a la disminución de la excreción de K⁺.

b) Fase de mantenimiento o poliúrica.- El daño al parénquima renal está ya establecido. Aumento del volumen en la micción (>2 L/día), debido a recuperación de las nefronas. Uremia, que es un síndrome debido a un

exceso de sustancias nitrogenadas en la sangre, ya que a pesar de la diuresis, el riñón aún no es capaz de excretar los productos de desecho.

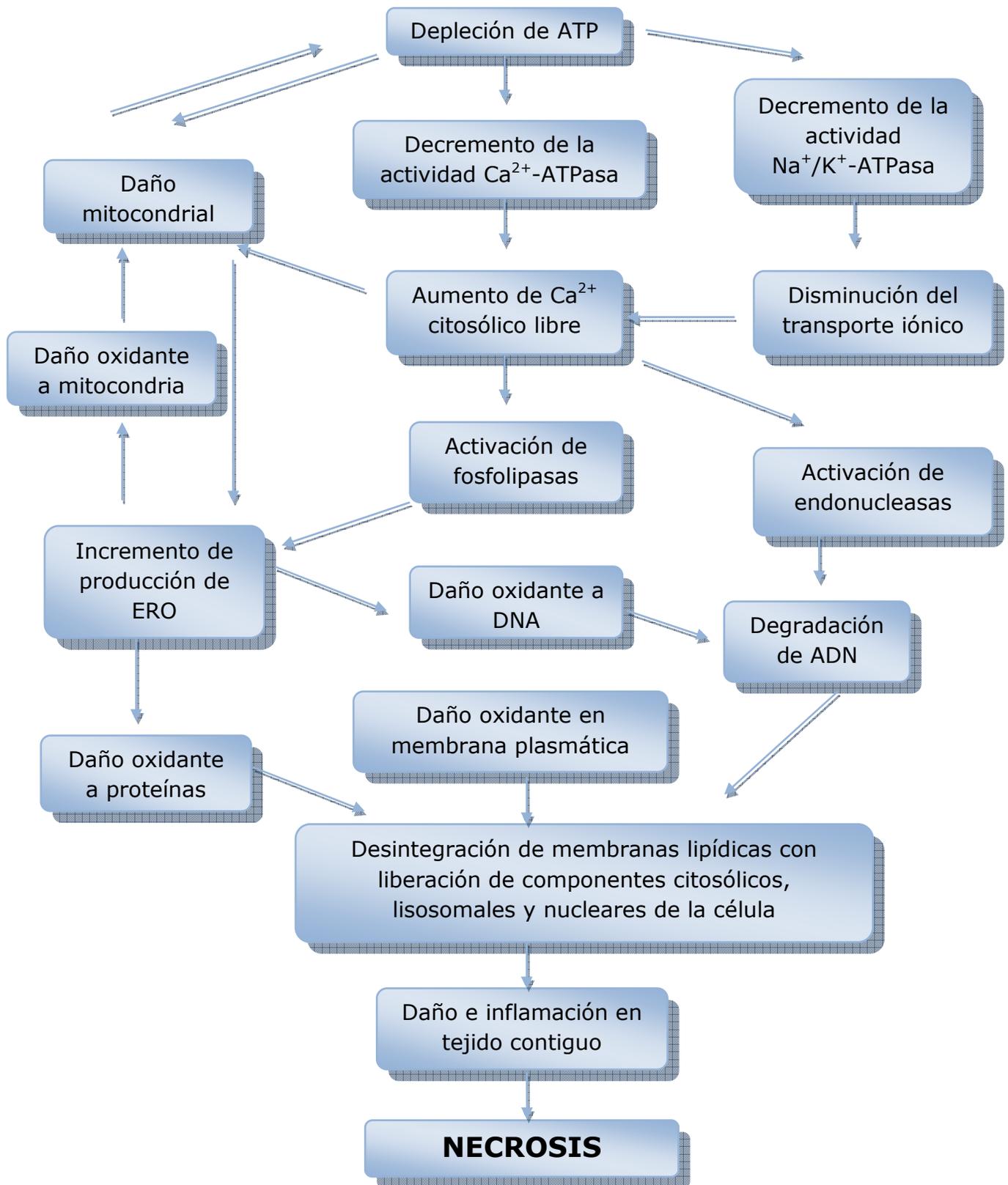
c) Fase de recuperación.- Período en que el riñón nuevamente es capaz de concentrar y diluir la orina según las necesidades del organismo. Los electrolitos y productos nitrogenados vuelven a sus valores normales. Esta fase puede durar varios meses, entre 3 y 12, durante los cuales suele presentarse una disminución residual de la función renal.

2.2.1. Insuficiencia renal aguda intrínseca

Desde un punto de vista clínico-patológico la IRA intrínseca, parenquimatosa o renal se clasifica en:

- Enfermedades que involucran vasos renales grandes.
- Enfermedades del glomérulo.
- Necrosis tubular aguda (NTA).
- Otros procesos que involucran al intersticio.

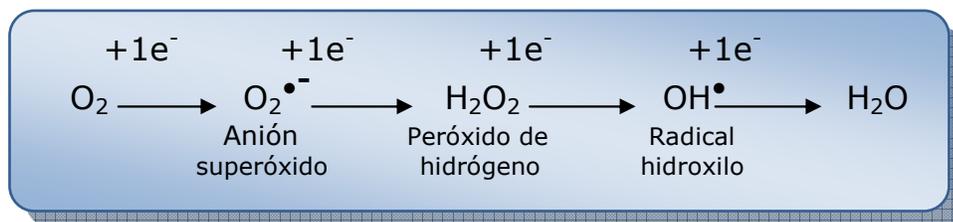
Es importante mencionar que de esta serie de lesiones que alteran la función renal, la NTA representa el 90% de los casos de la IRA intrínseca, es por ello que frecuentemente a este tipo de insuficiencia renal aguda se le denomina NTA. Dicha nefropatía se caracteriza por la generación de una serie de alteraciones estructurales y moleculares de las células tubulares, tales como la aparición de especies reactivas de oxígeno (ERO) (**BAUD & ARDAILLOU, 1993; ROVIN ET AL., 1990**), pérdida del borde de cepillo, disminución o desaparición de los procesos de absorción y excreción, incremento del calcio citosólico libre, acidosis intracelular, etc. (Esquema 3) (**BRENNER, 2005; SÁNCHEZ, 1993**).



Esquema 3. Diagrama de la respuesta metabólica a la insuficiencia renal aguda intrínseca.

2.3. Estrés oxidante

El oxígeno molecular es necesario para que se lleven a cabo reacciones metabólicas en los organismos aeróbicos. Es partícipe de la vía llamada cadena respiratoria, en la cual se genera adenosín trifosfato (ATP), esencial para llevar a cabo todos los procesos que requieren un gasto energético. En la cadena respiratoria, el oxígeno normalmente se consume casi en su totalidad, siendo empleado como aceptor final de electrones. Sin embargo, alrededor del 1% al 3% del oxígeno captado es transformado en compuestos altamente reactivos denominados especies reactivas de oxígeno (ERO). En la reducción univalente del oxígeno se generan tres de los intermediarios reactivos más importantes: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Reacción 1), que son capaces de alterar macromoléculas biológicas como: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos; si el daño es muy severo puede conducir a la muerte celular (HALLIWELL, 1995).



Reacción 1. Reducción univalente de la molécula de oxígeno.

Cuando en el organismo se produce un exceso de ERO y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser poco eficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidante. El estrés oxidante es una situación de desequilibrio con un aumento de oxidantes o con una disminución de

antioxidantes. El concepto de estrés oxidante como desequilibrio, implica que en condiciones fisiológicas normales debería existir un equilibrio o una situación de casi equilibrio entre oxidantes y antioxidantes (Esquema 4). Sin embargo, la situación real es altamente dinámica y está muy lejos de parecerse a un equilibrio estático: los oxidantes son producidos de manera continua como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidante, y los antioxidantes se encuentran en constante relación con ellos. En la condición de estrés oxidante, los oxidantes aumentan o los antioxidantes disminuyen de forma progresiva y continua, incluyendo sus respuestas adaptativas, lo que le confiere elasticidad y reversibilidad a la situación biológica (KONIGSBERG, 2008).



Esquema 4. Principales oxidantes y antioxidantes.

Los procesos de estrés oxidante no producen síntomas determinados, de ahí su peligrosidad. Si no es tratado, puede acelerar el envejecimiento y favorecer la aparición de ciertas enfermedades en cuya génesis o desarrollo intervienen de forma decisiva las ERO (**ZANÓN, 2008**).

2.3.1 Características de las principales ERO

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

La primera especie reactiva formada durante el proceso de reducción univalente del oxígeno es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). En condiciones normales esta especie es producida en bajas concentraciones por distintos sistemas enzimáticos, tales como el sistema xantina/xantina oxidasa (**LUO ET AL., 2001**); la lipooxigenasa (**TAKANO ET AL., 2001**); la ciclooxigenasa (**RIEGER ET AL., 2002**); y la NADPH oxidasa (**LI ET AL., 2002**); siendo las cadenas transportadoras de electrones la fuente de mayor importancia de su generación (**NORDBERG & ARNÉR, 2001**; **SAUER ET AL., 2001**). Puede interactuar con otras moléculas como el peróxido de hidrógeno en presencia de trazas de algún metal de transición, produciéndose el singulete de oxígeno y el radical hidroxilo, dos compuestos oxidantes más potentes (**KHAN & KASHA, 1994**). Tiene una vida media del orden de milisegundos y experimenta reacciones de dismutación, que consisten en la reacción entre dos moléculas de anión superóxido para dar lugar a la formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno (**GRISHAM, 1999**).

2.3.1.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La fuente de producción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) lo constituye el anión superóxido, por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD);

o bien por la reducción directa del oxígeno por dos electrones. Aunque no es un radical en sí, puede reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición para generar radical hidroxilo (**ARUOMA ET AL., 1991**). Su importancia radica en su habilidad de difundir a través de las membranas biológicas (**NATH ET AL., 2000**).

2.3.1.3. Radical hidroxilo (OH•)

Debido a su tiempo de vida media corta del orden de nanosegundos, el radical hidroxilo (OH•) es considerado como el oxidante más potente en los sistemas biológicos, debido a que reacciona de manera muy rápida con casi todas las moléculas biológicas (**FONG ET AL., 1976; LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994**). La generación de esta especie reactiva se ve favorecida por la presencia de metales de transición, mediante la reacción de Fenton (1894):



Reacción 2. Reacción de Fenton.

Así mismo, se puede generar por participación del anión superóxido mediante la reacción de Haber-Weiss (1934):



Reacción 3. Reacción de Haber-Weiss.

Ya que interactúa con la estructura más cercana y las células no cuentan con mecanismos enzimáticos que puedan combatirlo, estas deben

prevenir su formación mediante la eliminación de sus precursores, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.

2.4. Antioxidantes en los sistemas biológicos

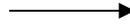
Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de las ERO, dichos mecanismos están basados en un sistema complejo de defensa constituido por los agentes antioxidantes. Un agente antioxidante, se define como aquella sustancia que presente en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable retarda o previene la oxidación. Cuando la producción de ERO se ve incrementada, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular. Existen dos tipos de sistemas antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos y su origen puede ser endógeno o exógeno (**VELÁZQUEZ ET AL., 2004**).

2.4.1. Sistema antioxidante enzimático

Existen enzimas con la capacidad de convertir al anión superóxido y peróxido de hidrógeno, en moléculas inocuas antes de que promuevan la generación de moléculas más reactivas tal como el radical hidroxilo. Entre estas enzimas podemos mencionar a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

a) Superóxido dismutasa (SOD).- Es considerada la primera enzima de defensa antioxidante, debido a que previene la formación del radical hidroxilo, catalizando la reacción de dismutación del anión superóxido (**ZANÓN, 2008**).





Reacción 4. Reacción del $O_2^{\bullet-}$ catalizada por la SOD.

Cabe mencionar que aunque con la dismutación del superóxido se obtiene otra especie reactiva de oxígeno, el peróxido de hidrógeno, este último compuesto es metabolizado por otras enzimas a agua y oxígeno, por lo que ya no se lleva a cabo la generación del radical hidroxilo.

b) Catalasa (CAT).- Enzima tetramérica responsable de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular **(CHENG ET AL., 1981)**. Se encuentra en altas concentraciones en hígado, riñón y eritrocitos **(AEBI, 1982)**.



Reacción 5. Reacción del H_2O_2 catalizada por CAT.

La importancia de esta enzima radica en el efecto tóxico del peróxido de hidrógeno debido a su gran capacidad de difusión, ya que puede atravesar libremente las membranas celulares y una vez dentro de la célula reaccionar con metales de transición para formar al radical hidroxilo **(KONIGSBERG, 2008)**.

c) Glutatión peroxidasa (GPx).- Enzima formada por cuatro subunidades idénticas que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos en presencia del glutatión reducido (GSH). Se han identificado 4 isoformas: citosólica, plasmática, gastrointestinal y la de fosfolípidos **(Yu, 1994)**.

2.4.2. Sistema antioxidante no enzimático

Está formado por compuestos no proteínicos que poseen la capacidad de interaccionar de manera directa con las ERO. Estos compuestos pueden ser de origen endógeno, producidos por el organismo (glutación); o exógeno, provenientes de la dieta (vitamina C, vitamina A, vitamina E y ajo). Entre los antioxidantes no enzimáticos más estudiados están:

a) Glutación (GSH).- Es uno de los tioles no proteínicos más estudiados a nivel intracelular, debido al papel crítico que juega en la fisiología y bioquímica celular. Poderoso antioxidante que protege contra los efectos dañinos de metales pesados, tabaco y alcohol. Limita la actividad del anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno. El GSH neutraliza a las ERO al radical hidroxilo y al anión superóxido, al transferirles un átomo de hidrógeno (**VELÁZQUEZ ET AL., 2004; BURK, 1990; GIBSON ET AL., 1985**).

b) Vitamina C (Ácido ascórbico).- Compuesto hidrosoluble, considerado un poderoso inhibidor de la oxidación de lípidos y regenerador de la vitamina E. Interviene en los procesos de desintoxicación, reaccionando contra las toxinas del tabaco. Actúa específicamente con el anión superóxido y el radical hidroxilo (**VELÁZQUEZ ET AL., 2004**).

c) Vitamina A (β -caroteno).- Compuesto liposoluble que se encuentra en las membranas lipídicas. Evita la oxidación de los lípidos al reaccionar principalmente con el radical hidroxilo (**KRINSKY & DENEKE, 1982**).

d) Vitamina E (α -tocoferol).- Principal antioxidante soluble en lípidos; previene la oxidación de grasas. Es considerado el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Aumenta su acción en presencia de zinc. Actúa específicamente sobre los radicales de ácido graso poli insaturado **(VELÁZQUEZ ET AL., 2004)**.

2.5. El ajo como antioxidante dietario

Un antioxidante dietario es una sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN) o ambas, sobre las funciones fisiológicas normales en seres humanos. En años recientes, ha aumentado el interés sobre las funciones bioquímicas protectoras de los antioxidantes naturales contenidos en plantas, ya que son candidatos para la prevención o protección del daño oxidante causado por radicales libres **(WONGMEKIATA & THAMPRASERTB, 2005)**.

El ajo (*Allium sativum L.*) es una planta perteneciente a la familia *Liliaceae*, originaria de Asia central, que ha sido usada históricamente para propósitos culinarios y medicinales, particularmente para el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento **(ISHIKAWA ET AL., 2009)**. Numerosos

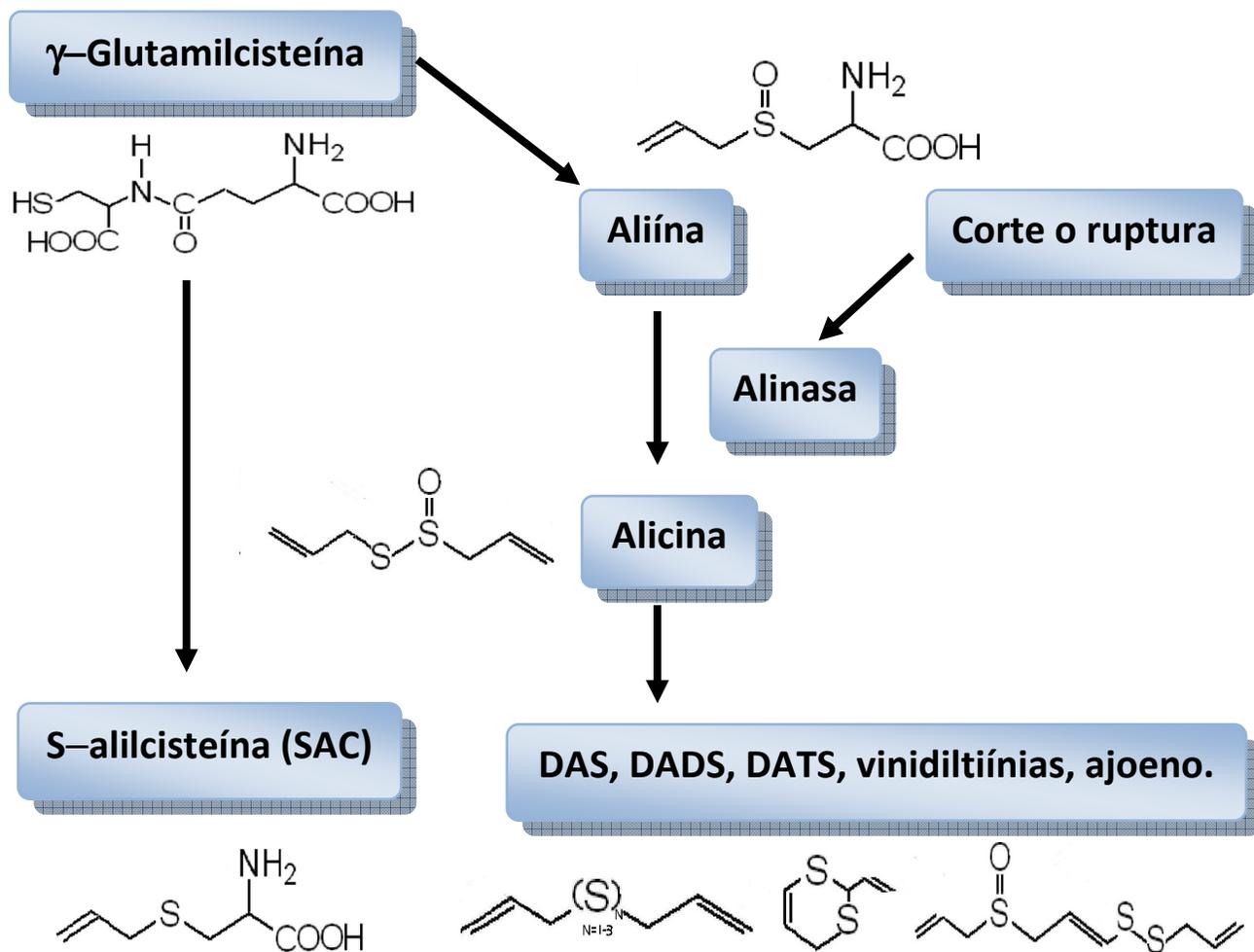


estudios en los últimos años han destacado otras importantes propiedades farmacológicas que posee esta planta, tales como el ser un agente antihipertensivo, antimicrobiano, hipoglucémico, inmunosupresor, anticancerígeno y antioxidante, siendo esta última propiedad la de importancia en este proyecto **(WONGMEKIATA & THAMPRASERTB, 2005)**.

Esquema 5. Ajo (*Allium sativum* L.)

El ajo contiene numerosos componentes activos, entre los que destacan sus compuestos azufrados. Todas las propiedades farmacológicas antes mencionadas se han atribuido a estos componentes que posee el ajo, a los cuales también se les atribuye el olor característico del mismo **(BERGINC ET AL., 2009)**.

Si el ajo se encuentra intacto y fresco contiene altas cantidades de γ -glutamilcisteínas, las cuales son hidrolizadas y oxidadas para formar aliína. Además de la aliína, en el ajo se encuentran otros compuestos azufrados solubles en medio acuoso, como la S-metil-L-cisteína, S-propenil-S-cisteína, S-glutación, γ -glutamil-S-alil cisteína, y γ -glutamil-S-alil-mercapto-L-cisteína. Después de un proceso de cortado, machacado o triturado, la enzima alinasa, convierte la aliína en alicina y otros compuestos azufrados (tiosulfatos), los cuales son muy inestables y se transforman con extrema rapidez en otros compuestos organosulfurados: dialilsulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS), dialiltrisulfuro (DATS) y ajoeno (Esquema 6), todos ellos solubles en medio oleoso. Los bulbos de la planta contienen 6mg/g de aliína, lo cual corresponde al 1.7% del peso seco del ajo y 2.8% de la proteína alinasa **(FUJISAWA ET AL., 2008; LÓPEZ, 2007)**. Además de estos compuestos, en la planta se encuentran sales minerales (selenio), azúcares, lípidos, aminoácidos esenciales, vitaminas, enzimas, flavonoides y otros compuestos fenólicos **(LÓPEZ, 2007)**.



Esquema 6. Cambios químicos en el ajo.

En la siguiente tabla se mencionan algunos de los compuestos azufrados del ajo más importantes y las actividades biológicas con las que se les ha relacionado (**GARCÍA & SÁNCHEZ-MUNIZ , 2000**).

Compuestos azufrados	Actividad biológica reportada
Alíina y Ajoeno (ajocisteína)	Hipotensor, hipoglucemiante, anticoagulante, antiinflamatorio, vasodilatador, antibiótico.
Alicina y Tiosulfinatos	Antibiótico, antifúngico, antiviral, hipocolesterolemiante, antitumoral, hipotensor.
Sulfuro de dialilo y afines	Hipocolesterolemiante, aumento de la producción de enzimas desintoxicantes, anticancerígeno, previene los daños químicos del ADN.
S-alil-cisteína	Hipocolesterolemiante, antioxidante, quimioprotector frente al cáncer, favorece la acción desintoxicante del hígado frente a sustancias químicas.

Tabla 2. Principales compuestos azufrados del ajo y su actividad biológica.

Existen diversos preparados del ajo cuya composición química depende del proceso al que se somete el ajo para su elaboración (Tabla 3). De todos ellos, el más estudiado en la actualidad es el extracto de ajo envejecido (EAE), el cual después de cuantiosos estudios ha mostrado tener efectos favorables en diversas patologías (**SUMIYOSHI, 1997; STEINER & LIN, 1998; STEINER ET AL, 1996; LAMM & RIGGS, 2001; BOREK, 2001; RAHMAN, 2000; OHNISHI & OHNISHI,**

2001; MORIGUCHI ET AL., 2001; ALLISON ET AL., 2006; EFENDY ET AL., 1997; USHIJIMA & SUMIOKA, 1997; YOU & BLOT, 1988; BUIATTI ET AL., 1989).

DIENTE DE AJO	
	(mg/g producto)
S-alilcisteína sulfóxido (aliína)	6.0–14.0
γ -glutamylcisteínas	5.0–15.0
Compuestos derivados de la aliína	3.5–8.0
EXTRACTO DE AJO ENVEJECIDO	
S-alilcisteína sulfóxido (aliína)	0.2–0.4
γ -glutamylcisteínas	0.2–0.5
γ -glutamyl-S-alilcisteína	0.1–0.4
S-alilcisteína	0.5–0.7
S-alilmercaptocisteína	0.1–0.2
Compuestos derivados de la aliína	0.1–0.2
POLVO DE AJO	
S-alilcisteína sulfóxido (aliína)	10.0–17.0
γ -glutamylcisteínas	12.0–35.0
Compuestos derivados de la aliína	4.0–11.0
ACEITE DE AJO	
Destilación con vapor:	
Dialildisulfuro	0.05–2.8
Dialiltrisulfuro	0.04–2.0
Alilmetiltrisulfuro	0.03–1.7
Compuestos derivados de la aliína	0.2–11
Macerado:	
Vinilditiínas	0.1–4.7
Ajoeno	0.02–1.1
Dialiltrisulfuro	0.02–0.45
Compuestos derivados de la aliína	0.4–6.0

Tabla 3. Distintas preparaciones de ajo y su composición.

2.5.1. Extracto de ajo envejecido (EAE)

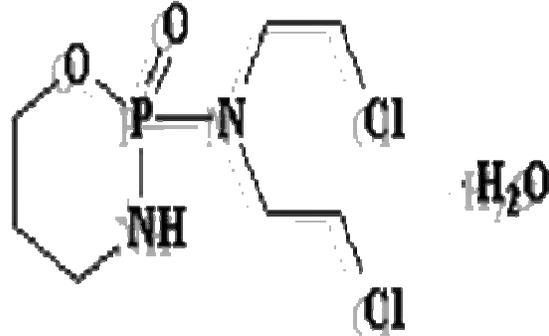
El extracto de ajo envejecido (EAE) es una preparación producida por una extracción prolongada de ajo fresco reposado por 20 meses en etanol 5-20% (p/v) a temperatura ambiente, proceso que tiene por objetivo eliminar la mayoría de las sustancias sulfuro que son solubles en aceite (DAS, DADS) y que son las que le otorgan las propiedades de sabor y olor al ajo crudo. Diversos experimentos han evidenciado la capacidad del EAE de ofrecer protección contra la oxidación inducida por varias enfermedades, incluso contra la nefrotoxicidad producida por la administración de algunos antibióticos, como la gentamicina (**WONGMEKIATA & THAMPASERTB, 2005; MALDONADO ET AL., 2003**).

El EAE tiene una mayor concentración de compuestos organosulfurados, tal como la S-alil-cisteína (SAC), el cual es un potente receptor de radicales libres, lo que le confiere al EAE una mayor actividad antioxidante que otras preparaciones de ajo (**AHMAD ET AL., 2007**).

A través de diversos estudios sobre el EAE se ha demostrado su utilidad en muchas áreas de la salud (**SUMIYOSHI, 1997**); por ejemplo, se ha asociado con la mejora del perfil de colesterol, (**STEINER & LIN,1998; STEINER ET AL, 1996**), disminuye los niveles de triglicéridos (**STEINER ET AL, 1996**), estimula al sistema inmune (**LAMM & RIGGS,2001**), mitiga los efectos de los oxidantes (**BOREK, 2001**), normaliza la presión arterial (**STEINER ET AL., 1996; RAHMAN, 2000**) , mejora la circulación (**OHNISHI & OHNISHI, 2001; MORIGUCHI ET AL., 2001**), inhibe la agregación plaquetaria (**ALLISON ET AL., 2006**), reduce el desarrollo de la aterosclerosis (**EFENDY ET AL., 1997**), reduce el estrés psicológico (**USHIJIMA & SUMIOKA, 1997**) e inhibe el crecimiento y desarrollo de algunos tipos de cáncer (**YOU & BLOT, 1988; BUIATTI ET AL., 1989**).

2.6. Ciclofosfamida

Es un fármaco antineoplásico que también tiene propiedades inmunosupresoras. Las indicaciones de la ciclofosfamida pueden reunirse en 4 grupos:



Esquema 7. Estructura de la Ciclofosfamida.

- a) Hemoblastosis, tumores linforreticulares, leucemias linfáticas y mieloides, particularmente crónicas linfogranulomatosis, linfosarcoma, reticulosarcoma, plasmocitoma.
- b) Tumores con crecimiento diseminado, particularmente carcinoma de ovario, de mama, bronquial a células pequeñas, neuroblastoma.
- c) Terapia adicional en el postoperatorio, especialmente en tumores quimiosensibles que presuntamente han sobrepasado los límites locales y que a pesar de la cirugía tienen un mal pronóstico.
- d) Enfermedades por autoinmunidad, lupus eritematoso sistémico, anemia autoinmune hemolítica y atrofia psoriásica (**ROSENSTEIN, 2004**).

Es un pro-fármaco que necesita ser activado por el sistema de enzimas microsomales hepáticas para ser citotóxico. Esta enzimas hepáticas

convierten la ciclofosfamida en primer lugar a aldofosfamida, 4-hidroxiciclofosfamida y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del ADN. Al reaccionar con el ADN, los agentes alquilantes forman unos puentes que impiden la duplicación del mismo y provocan la muerte de la célula. La ciclofosfamida y sus metabolitos activos actúan en todas las fases del ciclo celular, pero es más efectivo contra células en proliferación activa que en células en reposo.

Los metabolitos producidos son eliminados por vía renal. Con objeto de minimizar la exposición de los riñones a estos productos, se recomienda no administrar la ciclofosfamida por la noche, para evitar la acumulación de los metabolitos en la vejiga. Además los pacientes deberán ser hidratados para prevenir la cistitis hemorrágica y para diluir no sólo los metabolitos de la ciclofosfamida, sino también todos los desechos celulares producidos por los efectos citotóxicos del fármaco.

La CF puede producir pérdida de apetito, caída del cabello, erupciones en la piel, náuseas, vómito, dolor abdominal e inflamación de la vejiga causando hemorragia. La toxicidad hematológica es la principal reacción adversa de la ciclofosfamida. Se manifiesta como pancitopenia con leucopenia, neutropenia, anemia y/o trombocitopenia. Puede ocasionar infertilidad debido a la supresión de las funciones de las gónadas. Así mismo, la rápida lisis de las células leucémicas y linfáticas por la ciclofosfamida ocasiona un aumento de los niveles séricos de ácido úrico. Si no se administran uricosúricos, medicamentos que aumentan la excreción de ácido úrico en la orina, se observan niveles anormales de este ácido en las bioquímicas de rutina pudiendo resultar una nefropatía por ácido úrico y fallo renal agudo. Este problema es tanto mayor, cuanto más grande es la masa tumoral tratada.

3. ANTECEDENTES

Diversos estudios mencionan que las ERO desempeñan un papel importante en el desarrollo de la IRA (**NATH ET AL., 2000; HEINZ, 1983; BAUD & ARDAILLOU, 1986**). Debido a que se ha encontrado que las ERO se forman en los modelos de IRA por NTA, se han realizado estudios con el propósito de esclarecer el grado de participación de las mismas en la generación del daño renal. Además, se ha observado que en los modelos de nefrotoxicidad hay alteraciones en la cantidad y actividad de las enzimas antioxidantes, como es el caso de la CAT, SOD y GPx (**PEDRAZA ET AL., 1995, 1999, 2000; OZBEK ET AL., 2000; BARRERA ET AL., 2003; FAROMBI & EKOR, 2006**).

Se ha demostrado que el ajo fresco y muchos de sus preparados son eficaces para inhibir la formación de ERO y aumentar la actividad de enzimas antioxidantes celulares (SOD, CAT y GPx). Parece ser que aunque prácticamente todos los constituyentes del ajo poseen actividad antioxidante, el componente con mayor potencial es la S-alil-cisteína (SAC) que se encuentra mayoritariamente en la presentación de EAE (**LÓPEZ, 2007**).

En el modelo de IRA inducida por gentamicina se ha evidenciado la capacidad de protección del EAE contra el estrés oxidante y nitrosante inducidos por el fármaco. Los efectos adversos, como el aumento de BUN, CS, PT, actividad de NAG y necrosis de las células del túbulo proximal, pudieron ser prevenidos gracias a la administración del antioxidante. (**MALDONADO ET AL., 2003; WONGMEKIATA & THAMPRASERTB, 2005**).

4. JUSTIFICACIÓN

Los procesos de oxidación celular se presentan en todo momento en el organismo, sobre todo porque hay una gran diversidad de factores endógenos y exógenos que los favorecen; siendo estos últimos los de interés en este proyecto. Si bien es cierto que existen diversas defensas antioxidantes naturales en el organismo, éstas no son suficientes para contrarrestar el daño producido por agentes externos, es por ello que es importante el conocer otras alternativas que ayuden al ser humano a eliminar o disminuir el daño.

Así mismo, como ya se mencionó anteriormente, el riñón realiza funciones fisiológicas y bioquímicas importantes para la homeostasis del organismo, y aunque es cierto que la IRA es una enfermedad de carácter reversible, debemos hacer énfasis en que es así, siempre y cuando el insulto sea retirado, de lo contrario la IRA continúa hasta volverse crónica. Siendo ésta incurable y sus únicas alternativas la diálisis o el trasplante de riñón. Por otro lado la IRA suele ser una complicación de una enfermedad crónica o grave, lo cual disminuye las posibilidades de recuperación del riñón en comparación a un organismo que solo es afectado por la IRA.

La CF es uno de los antineoplásicos de mayor uso en la actualidad, indicado para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. A pesar de su gran utilidad, es capaz de ocasionar diversos efectos adversos en el organismo, siendo la insuficiencia renal aguda, uno de ellos. Es importante señalar que la frecuencia de aparición de esta nefrotoxicidad va en aumento debido al incremento en el número de casos de cáncer en nuestro país.

El investigar si un antioxidante dietario, tal como el extracto de ajo envejecido, es capaz de ejercer un efecto protector en este modelo experimental, nos permitirá tener una visión más completa que podría ser utilizada para diseñar nuevas estrategias encaminadas a disminuir la insuficiencia renal aguda intrínseca inducida por ciclofosfamida y mediada por estrés oxidante.

5. HIPÓTESIS

El extracto de ajo envejecido será capaz de prevenir el daño renal inducido por la ciclofosfamida. Es posible que esta protección o prevención solamente sea parcial debido a que el estrés oxidante no es el único mecanismo de daño de este fármaco.

Sin embargo; si el estrés oxidante fuera el principal o el primer evento de daño inducido por el antineoplásico, los componentes antioxidantes del extracto de ajo envejecido, podrían evitar la cascada de eventos que ocurren para generar la insuficiencia renal aguda.

6. OBJETIVO GENERAL

Investigar si el extracto de ajo envejecido es capaz de disminuir la insuficiencia renal aguda y el estrés oxidante ocasionados por la administración de ciclofosfamida.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el modelo de IRA inducida por CF en ratas.
 - Medir la función renal.

Evaluar el efecto protector del EAE en la IRA inducida por CF.

- Determinar el daño renal.
- Evaluar el estrés oxidante en riñón

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Reactivos

Para las determinaciones de creatinina en suero (CS), depuración de creatinina (DC) y nitrógeno de urea en sangre (BUN) se emplearon kits comerciales SPINREACT de LAB CENTER DE MÉXICO. El ácido tiobarbitúrico, el tetrametoxipropano, el mesilato de deferoxamina, el nitroazul de tetrazolio, el NADPH, el BHT, la glutatión reductasa, el glutatión reducido, la albúmina sérica bovina, el reactivo de Folin, el carbonato sódico, el p-nitrofenol-N-acetil- β -D-glucosaminido, la xantina y la xantina oxidasa fueron de SIGMA CHEMICAL. El etanol, el fosfato de potasio monobásico, el fosfato de sodio dibásico, el butanol, la piridina, el ácido clorhídrico, el ácido tricloroacético, el tartrato sódico potásico, el peróxido de hidrógeno, el sulfato de amonio y la sal disódica del ácido etileno diamino tetraacético fueron de JT BAKER. El sulfato cúprico y el carbonato de sodio fueron de MALLINCKRODT. El cloruro de cobre fue de RIEDEL-DE HAËN.

8.2. Fármaco y antioxidante

La solución de CF (HIDROFOSMIN[®], de LABORATORIOS SANFER, S.A. de C.V.) se preparó el mismo día de su uso. Se pesó la cantidad requerida en cada protocolo y se disolvió en agua destilada hasta obtener una concentración final de 20 mg/mL. La dosis administrada de CF fue de 100 mg/kg. El EAE (KYOLIC[®], de WAKUNAGA OF AMERICA) se administró a una dosis de 1.2 mL/kg.

8.3. Sujetos experimentales

Se emplearon ratas macho cepa Wistar entre 250-300 g de peso, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se

mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en cajas metabólicas (NALGE COMPANY), con ciclos artificiales de luz-oscuridad de 12 h (6:00 a.m. -18:00 p.m.). El alimento (RODENT LABORATORY CHOW) y el agua se proporcionaron *ad libitum* durante todo el estudio. Todos los procedimientos se realizaron acorde con los principios éticos para el uso de animales.

8.4. Diseño experimental

a) Búsqueda de la dosis de daño por CF

La primera parte del proyecto consistió en la búsqueda de la dosis donde el daño renal producido por la CF fuera evidente. Para ello se formaron 4 grupos al azar de 2-3 sujetos experimentales cada uno. Los grupos se dividieron de la siguiente manera:

- 1) Grupo control (CT)- Dosis de solución salina isotónica (SSI)= 1.2 mL/kg.
- 2) Grupo CF 1- Dosis de CF= 100 mg/kg.
- 3) Grupo CF 2- Dosis de CF= 150 mg/kg.
- 4) Grupo CF 3- Dosis de CF= 200 mg/kg.

La IRA fue inducida mediante la administración diaria de CF por vía intraperitoneal (i.p.) con la dosis respectiva para cada grupo. Los sujetos experimentales fueron pesados antes, durante y al final del protocolo, cuya duración fue de 5 días. A partir del día 1 se recolectaron muestras de orina para las determinaciones de proteínas totales (PT) y actividad de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG). Al término del mismo, se sacrificó a los sujetos experimentales por decapitación y se recolectaron muestras de orina y de sangre para las determinaciones de creatinina en suero (CS), depuración de creatinina (DC), nitrógeno de urea en sangre (BUN),

cuantificación de proteínas totales en orina (PT) y actividad de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG).

b) Evaluación del efecto protector del EAE en el daño renal inducido por CF (100 mg/kg)

Se realizaron otros protocolos experimentales con una duración de 2 días, integrados por 5 grupos de 2-4 sujetos experimentales cada uno:

- 1) Grupo CT- SSI= 1.2 mL/kg (i.p.)
- 2) Grupo EAE= 1.2 mL/Kg (i.p.)
- 3) Grupo CF= 100 mg/kg (i.p.)
- 4) Grupo CF+ EAE= 100 mg/kg (i.p.) + 1.2 mL/kg (i.p.)

La administración del antioxidante (EAE) comenzó 48 horas antes (tiempo -48 h) de la administración del antineoplásico. La CF se administró en el tiempo 0. En los tiempos en que no se debía administrar ningún compuesto a las ratas se les inyectó SSI. Los sujetos experimentales se sacrificaron 48 horas después de la administración de CF. Los riñones de los sujetos experimentales fueron extraídos para su posterior estudio.

c) Evaluación del estrés oxidante

Para esta parte se realizaron dos determinaciones; por un lado, se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes del riñón; y por otro, se midió un marcador de estrés oxidante. En ambos casos; se prepararon homogenados de riñón completo, conforme a técnicas ya establecidas para cada determinación.

8.5. Muestras

Orina. Las muestras de orina se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga Hettich Zentrifugen EBA 20. Se tomaron alícuotas de 1.0 mL y se conservaron a -20°C en tubos de microfuga.

Suero. Después de sacrificar a los sujetos experimentales, se recolectó la sangre de cada uno en tubos de vidrio; las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas de 1.0 mL que se conservaron en tubos de microfuga a -20°C.

Riñón. Los riñones de todos los sujetos experimentales fueron extraídos y cortados transversalmente, se mantuvieron a -20°C en papel aluminio.

Homogenado para el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. El homogenado de riñón completo se preparó en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 que contenía BHT 0.1 M, empleando un homogenador tipo Polytron PT 10-35 durante 20 segundos, después se sonicaron durante 10 segundos con el equipo SONICS-vibra cells. Se utilizó una dilución de tejido 1:10 (p/v). Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso.

Homogenado para la determinación de actividad enzimática. El homogenado de riñón se preparó en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, tritón 1%, empleando el homogenador durante 20 segundos. Se utilizó

una dilución de tejido 1:4 (p/v). Los homogenados se centrifugaron en una microcentrífuga Beckman a 15,300 rpm durante 1 hora a 4°C.

Cuantificación de proteínas. Se realizó conforme al método colorimétrico de Lowry (1951).

8.6. Evaluación del daño renal

8.6.1 Daño tubular

8.6.1.1. Actividad de la enzima N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) en orina

La excreción urinaria de enzimas lisosomales, como la N-acetil-β-D-glucosaminidasa, es un marcador de daño en el túbulo renal proximal (**LOCKWOOD & BOSMANN, 1979**).

La actividad de NAG, se determinó a través de un ensayo basado en la conversión del p-nitrofenol-N-acetil-β-D-glucosaminido en p-nitrofenol, que en condiciones ácidas es incoloro y se encuentra protonado. Al alcalinizar el medio el p-nitrofenol pasa de su forma protonada a la aniónica que absorbe a 405 nm. Se emplearon 50 µL de orina sin diluir, se agregaron 375 µL de amortiguador de citratos 50 mM, pH 4.4 y 125 µL de sustrato p-nitrofenol-β-D-glucosaminido 30 mM (**JUNG ET AL., 1991**). Para determinar la absorción basal de cada muestra se preparó un blanco sin sustrato y para evaluar la conversión espontánea del sustrato se preparó un blanco sin muestra de orina. Los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C por 15 min. Se detuvo la reacción con 500 µL de Na₂CO₃ 0.2 M, pH 10.4. Las muestras se leyeron a 405 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de p-nitrofenol en un intervalo de 0.00015 a 0.15 µmol. Se calcularon las unidades (U) de NAG/24 h. Donde U= cantidad de enzima que libera 1 µmol

de p-nitrofenol por minuto. Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.6.1.2. Cuantificación de proteínas en orina

Un aumento en la excreción urinaria de proteínas puede ser indicativo de daño renal tubular y glomerular (**PEDRAZA ET AL., 1995**).

El método utilizado está basado en la precipitación de proteínas totales en orina con ácido tricloroacético (TCA), y la medición de su turbidez a 420 nm (**PEDRAZA ET AL., 1999**). Las muestras de orina se diluyeron 1:5 con solución salina isotónica hasta un volumen final de 2 mL, después se separaron en 2 alícuotas de 1 mL, a una de ellas se le agregó 250 µL de TCA al 12.5% y a la otra 250 µL de solución salina, empleada como blanco de cada muestra. Los tubos se dejaron incubando a temperatura ambiente por 10 min. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) en un intervalo de 0.04 a 0.8 mg/mL. Se calcularon los mg de proteína/24h. Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.6.2. Función glomerular

8.6.2.1. Creatinina en suero (CS)

La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos, y puede ser transformada en ATP, fuente de energía para las células. Se elimina a través del riñón. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de creatinina son indicativos de patología renal.

La determinación de la creatinina en las muestras se realizó mediante la reacción de Jaffé, procedimiento basado en la formación de un complejo rojizo (2,4,6-trinitrofenol) entre la creatinina y el picrato en un medio alcalino, el producto formado absorbe a 520 nm. La absorbancia del complejo es directamente proporcional a la concentración de la creatinina presente en la muestra ensayada. En una celda se adicionaron 50 µL del suero y 500 µL de la mezcla de reacción (ácido pícrico 17.5 mM e hidróxido de sodio 0.29 M, 1:1) se hicieron lecturas a los 0, 30, 60 y 90 seg. Antes de realizar las lecturas de la muestra, el espectrofotómetro (BECKMAN COULTER), se ajustó a cero frente a agua destilada. Después se leyó el patrón de creatinina de 2 mg/dL a los mismos tiempos antes mencionados, para dar paso a las lecturas de las muestras. La cantidad de creatinina presente en las muestras; se determinó calculando el cociente de las diferencias de densidad óptica de las lecturas de 90 y 30 seg, entre las del patrón, y multiplicando por la concentración del mismo. Se calcularon los mg de creatinina/dL. Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.6.2.2. Depuración de creatinina (DC)

La DC se emplea como marcador para evaluar la función renal, específicamente midiendo la velocidad de filtración glomerular (**PEDRAZA ET AL., 1999**).

Para esta parte fue necesario determinar la concentración de creatinina en orina, de la misma forma que en las muestras de suero. Ya con los datos obtenidos la depuración se calculó de la siguiente manera:

$$DC \text{ (mL/min)} = \frac{\text{CREATININA EN ORINA (mg/dL)} * \text{VOLUMEN URINARIO DE 24 HORAS (mL)}}{\text{CREATININA EN SUERO (mg/dL)} * 1440 \text{ (min)}}$$

Nota: El factor 1440 indica los minutos que hay en 24 h

8.6.2.3. Nitrógeno de urea en sangre (BUN)

La urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas. La concentración de urea en sangre; aumenta como consecuencia de dietas con exceso de proteínas, enfermedades renales, insuficiencia cardiaca, hemorragias gástricas e hipovolemia.

Para la determinación de BUN; se empleó el método de UV, el cual se basa en una reacción acoplada en la que el α -cetoglutarato, por acción de la glutamato deshidrogenasa pasa a L-glutamato, la cual emplea como cofactor al NADH presente en el medio y al amonio producido por la ureasa. La disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada. Las muestras se leen espectrofotométricamente a 340 nm. En una celda se adicionaron 5 μ L del suero y 500 μ L de la mezcla de reacción (R1: TRIS, pH 7.8, 80 mM + α -cetoglutarato 6 mM + ureasa 75000 U/L; R2: GLDH 60000 U/L + NADH 0.32 mM; 4:1). Se hicieron lecturas a los 0, 30, 60 y 90 seg. Antes de realizar las lecturas de la muestra el espectrofotómetro se ajustó a cero frente a agua destilada. Después se leyó el patrón de urea de 50 mg/dL. La cantidad de BUN presente en las muestras se determinó calculando el cociente de las diferencias de densidad óptica (D.O.) de las lecturas de 30 y 90 seg, entre las del patrón y multiplicando por la concentración del mismo, con lo cual obtenemos la cantidad de urea (mg/dL) de cada muestra. La cantidad de nitrógeno de urea en sangre (BUN) se calcula dividiendo la cantidad de urea entre 2.14, factor que indica el número de átomos de nitrógeno presentes en la molécula de urea. Se calcularon los mg de BUN/dL.

Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.7. Evaluación del estrés oxidante

8.7.1 Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón

8.7.1.1. Actividad de la enzima superóxido dismutasa total (SOD)

La actividad de esta enzima se determinó por la reacción de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) (**OBERLEY & SPITZ, 1984**). Para ello se preparó una solución de xantina oxidasa con una concentración de 168 U/L y una mezcla de reacción que contenía en concentración final: xantina 0.122 mM, EDTA 0.122 mM, NBT 30.6 μ M, ASB 0.006% y carbonato de sodio 49 mM. Se colocaron 2.45 mL de la mezcla de reacción en dos tubos de ensayo que se mantuvieron a 27°C. Después se agregó 0.5 mL del homogenado renal diluido 1:100 con agua destilada, la reacción se inició inmediatamente agregando 50 μ L de la solución de xantina oxidasa. Se realizó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos pero sustituyendo la xantina oxidasa por agua. Simultáneamente se preparó un blanco de comparación el cual contenía xantina oxidasa pero sin homogenado. Los tubos se incubaron por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó 1 mL de cloruro cúprico 0.8 mM y se leyeron a 560 nm. Se calcularon las U de SOD/ mg de proteína. Donde U= cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT. Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.7.1.2. Actividad de la enzima catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa (CAT) se determinó por el método de Aebi (1982). En una celda de cuarzo se adicionaron 25 μL del homogenado diluido 1:100 en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.0. Se mezcló con 725 μL de H_2O_2 , 7.7 mM en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.0. Se hicieron lecturas a 240 nm a los 0, 15 y 30 segundos (lapso de tiempo en que la descomposición del H_2O_2 sigue una cinética de primer orden). Se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, que se define de acuerdo a la siguiente expresión: $K = (1/t)(2.3 * \log A_1/[A_2])$, donde $t = t_2 - t_1$, A_1 y A_2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.7.1.3. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se hizo empleando el método de Lawrence y Burk (1976), el cual se basa en la disminución de la densidad óptica a 340 nm producido por el consumo de NADPH en la reacción de regeneración de glutatión. Se hizo una dilución del homogenado 1:10 con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Se tomaron 100 μL de la dilución que se mezclaron con 800 μL de la mezcla de reacción (Fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0; EDTA 1 mM; azida de sodio 1 mM, NADPH 0.2 mM; 1 unidad de glutatión reductasa/mL; glutatión reducido 1 mM) y se dejaron incubar por 5 minutos. Se preparó un blanco con la mezcla de reacción añadiendo amortiguador de fosfatos en vez del homogenado. Transcurrido el tiempo de incubación, se colocó en la celda 0.1 mL de la solución sustrato (2 μL de H_2O_2 al 30% + 10 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0) y la muestra a determinar. Anteriormente el espectro se ajustó a cero frente a amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0. Las lecturas se realizaron cada minuto por un lapso de 3 minutos. Se calcularon las U/ mg de proteína. Donde U = μmol de NADPH oxidado en un minuto. Los

resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.7.2 Evaluación de un marcador de estrés oxidante

8.7.2.1. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método se basa en que algunos productos formados a consecuencia de la interacción de radicales libres con moléculas celulares, pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en condiciones de calentamiento y a pH bajo formando un cromógeno rosa (YAGI, 1998; ARMSTRONG *ET AL.*, 1994; LEF'EVRE, 1998; JANERO, 1998). Se midió el contenido de proteínas por el método de Lowry (1951), a las muestras de homogenado preparado para el ensayo de TBARS. Posteriormente, se colocó lo equivalente a 0.5 mg de proteína de cada muestra en tubos de vidrio, y se llevó el volumen a 100 μ L con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se añadieron 500 μ L de solución TBA/HCl/TCA/DFO (ácido tiobarbitúrico/ácido clorhídrico/ácido tricloroacético/mesilato de deferoxamina) a cada uno de los tubos (incluidos el blanco y los estándares que se preparan en el primer caso con amortiguador en vez de muestra y en el segundo caso con malondialdehído) Los tubos se agitaron en el vórtex (VORTEX-GENE 2, G-560) y se colocaron en agua hirviendo por 10 minutos. Después se añadió 0.5 mL de butanol/piridina (15:1 v/v) a cada tubo con muestra. Se volvieron a agitar en el vórtex y se centrifugaron a 3,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo la fase superior de cada tubo y las muestras se leyeron a 532 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón de MDA. Se calcularon los nmol MDA/mg proteína. Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8.8. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa Prism (versión 3.02, GraphPad, San Diego, CA) por análisis ANOVA, post test DUNNET. Utilizando el valor de la media \pm EEM. Un valor de $P < 0.05$ vs CT o CF, fue considerado como significativo.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Búsqueda de la dosis de daño por CF

En la primera parte de este trabajo se buscó la dosis adecuada para establecer el modelo de daño renal por CF. Para ello la IRA se indujo mediante la administración vía intraperitoneal (i.p.) del antineoplásico a 3 distintas dosis, en un rango de 100-200 mg/kg. Los parámetros evaluados fueron: peso, volumen de orina, proteínas totales en orina (PT), creatinina en suero (CS), depuración de creatinina (DC), nitrógeno de urea en sangre (BUN) y actividad de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG).

Los resultados obtenidos en éste y todos los protocolos se presentan de manera normalizada, a excepción de los del peso corporal y el volumen de orina. La normalización consiste en relacionar cada dato obtenido con el promedio de los sujetos del grupo CT. Esto se hizo porque se presentan variaciones en las mediciones obtenidas de los parámetros entre un protocolo y otro, ya que a pesar de que los reactivos se mantuvieron bajo las condiciones que indica el fabricante, una misma muestra presenta pequeñas diferencias al realizar la cuantificación cuando el reactivo es nuevo a cuando está por terminarse. Sin embargo; el porcentaje de variación de una muestra de un sujeto normal y uno con IRA es semejante.

En la figura 1, que corresponde al peso de los sujetos experimentales antes, durante y al final del protocolo, se observó que en todos los grupos tratados con CF hubo una tendencia a disminuir conforme transcurrió el tiempo, contrario a los sujetos del grupo CT, los cuales mantuvieron su peso a lo largo del protocolo. Se observó diferencia estadística ($P < 0.0001$) a partir del día 4, entre los grupos de las dosis más altas (150 mg/kg, 200 mg/kg) y

el grupo CT. En el día 5 existió diferencia estadística entre el grupo CT y el grupo de la dosis de 100 mg/kg.

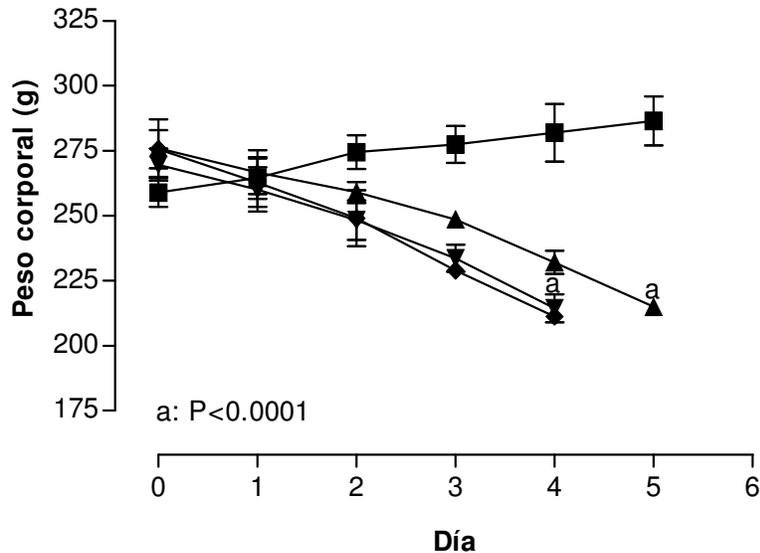


Figura 1. Búsqueda de la dosis de daño por CF. Peso corporal de ratas administradas con diferentes dosis de CF. Grupos: CT (■), CF=100 mg/kg (▲), CF=150 mg/kg (▼), CF=200 mg/kg (◆). Promedio \pm EEM. n = 2-3. a: P<0.05 vs CT.

En la figura 2, correspondiente al volumen de orina de las ratas, no se observó diferencia estadística alguna. El grupo CT mantuvo constante los volúmenes de orina a lo largo del experimento, contrario al grupo tratado con CF=200 mg/kg, que es el grupo en el que se puede apreciar de manera clara una tendencia a la disminución de los volúmenes. Contrario a lo que sucedió con el grupo tratado con CF= 100 mg/kg, en donde se observó que durante los tres primeros días hubo una tendencia de aumento de los volúmenes de orina, para después disminuir entre los días 3 y 5, similarmente a lo que ocurrió con el grupo de dosis intermedia.

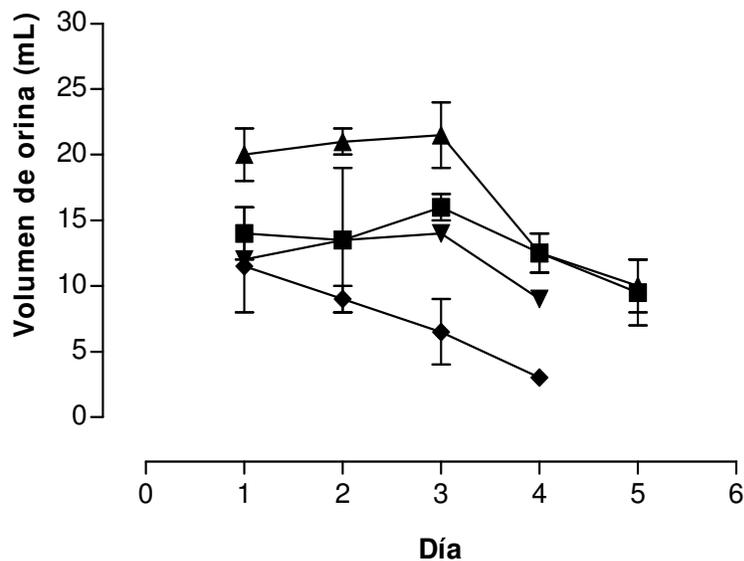


Figura 2. Búsqueda de la dosis de daño por CF. Volumen de orina de ratas administradas con diferentes dosis de CF. Grupos: CT (■), CF=100 mg/kg (▲), CF=150 mg/kg (▼), CF=200 mg/kg (◆). Promedio \pm EEM. n = 2-3. a: $P < 0.05$ vs CT.

En cuanto a los marcadores de daño tubular (Figura 3) se observó que el grupo CT mantuvo sus niveles de PT constantes a lo largo del protocolo, mientras que el resto de los grupos aumentaron la eliminación de proteínas en orina. El nivel más alto de PT lo observamos en el día 1 para las 3 dosis de CF; el grupo con la dosis más alta (200 mg/kg) presentó la mayor proteinuria ($P < 0.0001$), y los grupos con dosis de 100 y 150 mg/kg presentaron niveles de PT semejantes. Los tres grupos tratados con CF regresaron a niveles normales de PT entre los días 3-5.

Respecto a la actividad de la enzima NAG, se observó que todos los grupos tratados con CF, presentaron pequeñas variaciones dentro de los parámetros considerados como normales en rata.

De manera conjunta, podemos decir que se esperaba que los niveles de PT y la actividad de NAG aumentaran en los grupos tratados con el fármaco, porque indican que el túbulo fue dañado y los restos celulares son eliminados por la orina. Sin embargo; solo se observó la presencia de proteínas, pero sin aumento de la enzima característica (NAG) de las células del túbulo proximal. Por tanto, esto sugiere que las proteínas están presentes por un mal funcionamiento del glomérulo. Esto lo comprobamos al realizar una electroforesis desnaturalizante de las proteínas en orina; donde observamos que la proteína más abundante es una de peso molecular de 66 kDa, peso que corresponde a la albúmina. En cambio, en las muestras de ratas del grupo CT, se observan diferentes proteínas de pesos moleculares, entre 17 y 6 kDa; estas proteínas corresponden a restos celulares por descamación.

En la literatura no se reportan datos sobre la proteinuria por CF, solo inflamación del túbulo y una ligera disminución de algunas enzimas lisosomales como NAG (**ABRAHAM, ET AL., 2007**). Esta característica coincide con lo que obtuvimos. Es posible que no exista información porque nadie ha observado la proteinuria; sin embargo, los datos de BUN y CS también coinciden con los observados en nuestros animales de experimentación (**SENTHILKUMAR, ET AL., 2006**).

Por tanto, los parámetros de daño tubular ya no se evaluaron en protocolos posteriores.

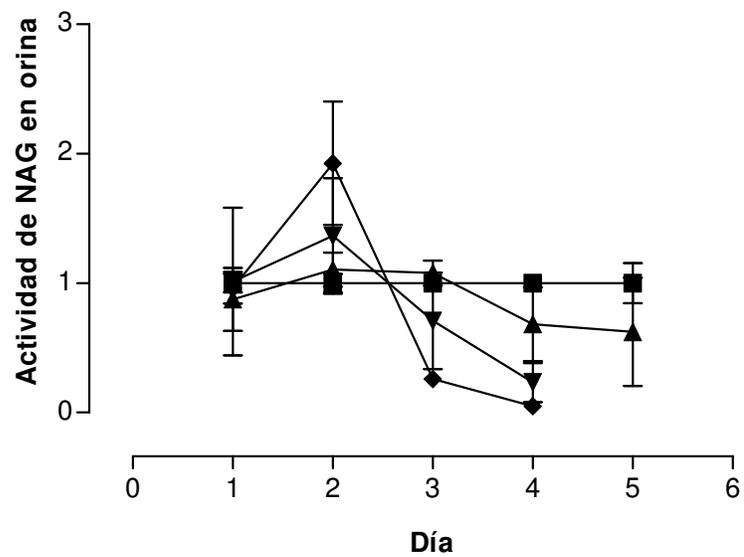
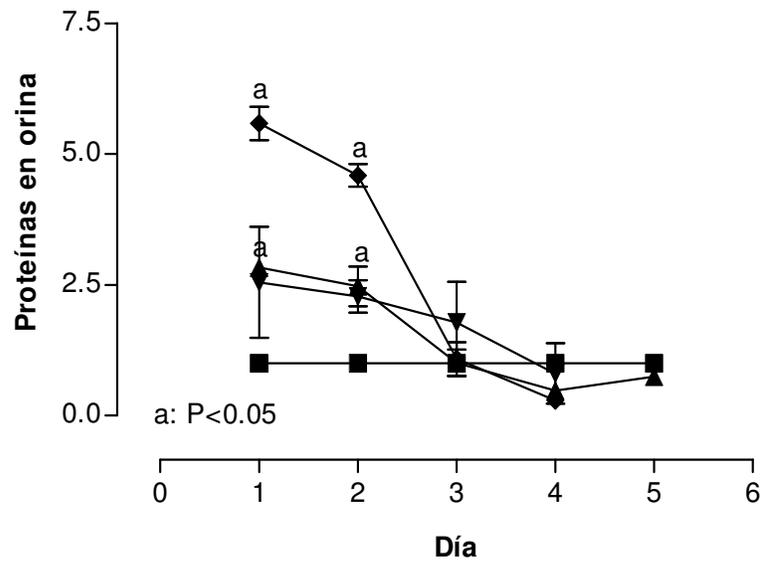


Figura 3. Búsqueda de la dosis de daño de CF. Marcadores de daño tubular. Grupos: CT (■), CF=100 mg/kg (▲), CF=150 mg/kg (▼), CF=200 mg/kg (◆). Promedio \pm EEM. n = 2-10. a: $P < 0.05$ vs CT.

Las determinaciones de los marcadores de daño glomerular (Figura 4) se realizaron al término del protocolo, sin embargo; se realizó otro con características similares para obtener los datos del día 1 y 2 para la dosis de

CF=100 mg/kg, y así poder observar el comportamiento de este grupo desde el día 1 hasta el 5. Las determinaciones de los otros grupos tratados con el antineoplásico no se realizaron por cuestiones que posteriormente serán mencionadas.

La determinación de CS en los días 2 y 5, mostró diferencia estadística en la dosis de 100 mg/kg comparadas con el grupo CT. Mientras que los parámetros de BUN y DC mostraron diferencia pero solo en el día 2 a la misma dosis.

En cuanto a CS se observó que los niveles del grupo CT se mantuvieron constantes, y los valores de los grupos tratados con CF siempre estuvieron por encima de los del grupo CT. Sin embargo; en las dosis más altas se observó una gran dispersión de los datos, siendo la dosis de CF=100 mg/kg la única en la que se veía claramente el aumento de creatinina. En el caso de DC, los niveles en el grupo CT se mantuvieron constantes; mientras que los niveles en los grupos tratados con CF se mantuvieron siempre por debajo con respecto al grupo CT, pero por la dispersión obtenida de los datos, solo fue posible evidenciar la disminución de DC en el grupo tratado con CF=100 mg/kg al día 2.

Con respecto a BUN ocurrió algo similar a CS. Los valores del grupo CT se mantuvieron constantes, mientras que los valores de los grupos tratados con el antineoplásico estuvieron por encima de los del grupo CT, mostrando también una alta dispersión; excepto al segundo día en el grupo tratado con CF=100 mg/kg, donde se observó diferencia estadística ($p < 0.0001$) respecto al grupo CT.

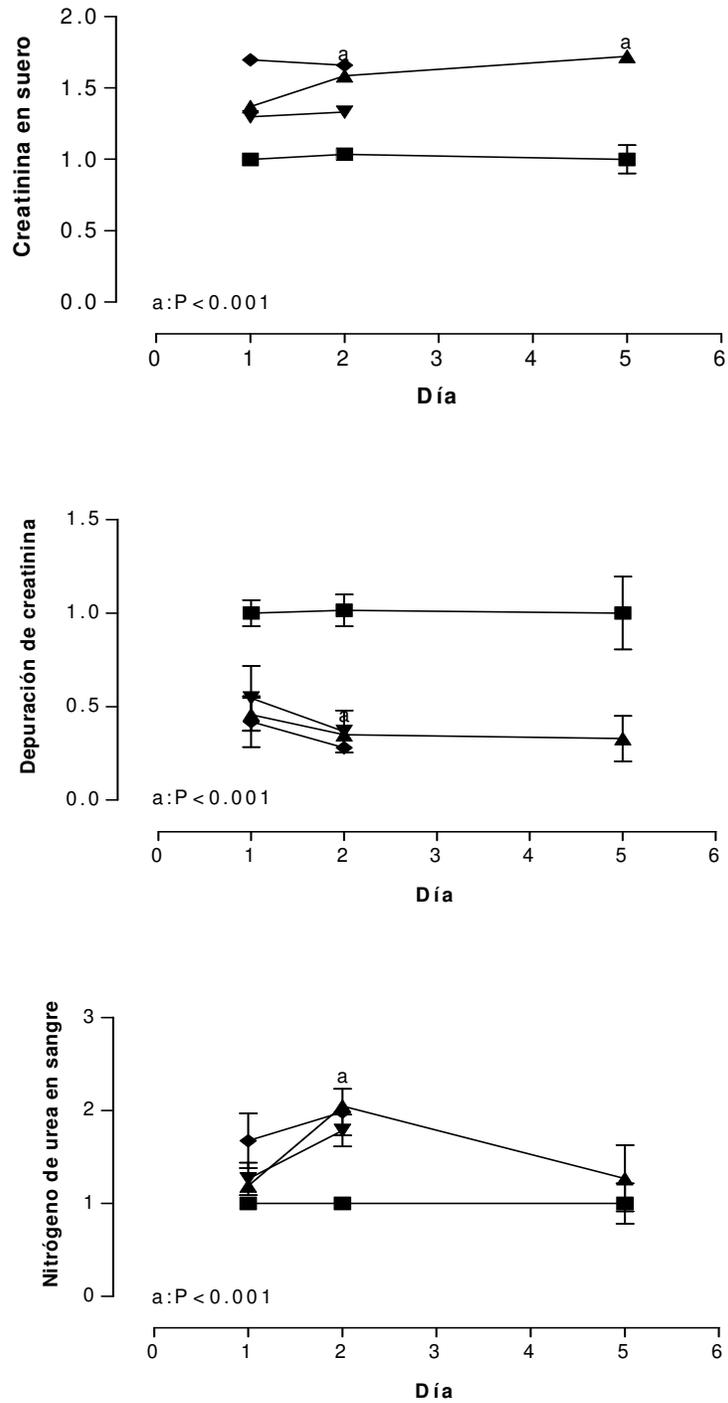


Figura 4. Búsqueda de la dosis de daño por CF. Marcadores de daño glomerular. Grupos: CT (■), CF=100 mg/kg (▲), CF=150 mg/kg (▼), CF=200 mg/kg (◆). Promedio \pm EEM. n = 2-4. a: P<0.05 vs CT.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió utilizar una dosis de CF= 100 mg/kg para los siguientes experimentos; ya que a esta dosis obtuvimos un daño renal evidente, manteniendo la integridad de los sujetos experimentales, es decir, evitamos la muerte de los sujetos. Como se puede apreciar en las gráficas anteriores, los resultados para el día 5 de las dosis de 150 mg/kg y 200 mg/kg no pudieron reportarse debido a que los sujetos experimentales murieron antes de finalizar el protocolo, por lo que se decidió no utilizar nuevamente estas dosis. Aunado a eso, en los parámetros evaluados se observó que para la dosis de CF= 100 mg/kg existió diferencia estadística al 2do día de tratamiento comparado con el grupo CT, por lo que se eligió este día como el idóneo para realizar los experimentos posteriores.

b) Evaluación del efecto protector del EAE en el daño renal inducido por CF (100 mg/kg)

Basados en los resultados de los experimentos antes realizados, los siguientes protocolos se realizaron con las siguientes características: dosis de CF= 100 mg/kg y duración de 48 h. El EAE se administró 48 horas antes (tiempo -48 h) de la administración del antineoplásico. La CF se administró cada 24 h por 2 días. En los tiempos en que no se debía administrar ningún compuesto a las ratas se les inyectó SSI. Los sujetos experimentales se sacrificaron 48 horas después de la administración de CF. Se formaron 4 grupos de 2-4 sujetos experimentales cada uno en cada protocolo:

- 1) Grupo CT- SSI= 1.2 mL/kg (i.p.)
 - 2) Grupo EAE= 1.2 mL/kg (i.p.)
 - 3) Grupo CF= 100 mg/kg (i.p.)
 - 4) Grupo CF+ EAE= 100 mg/kg (i.p.) + 1.2 mL/kg (i.p.)
-

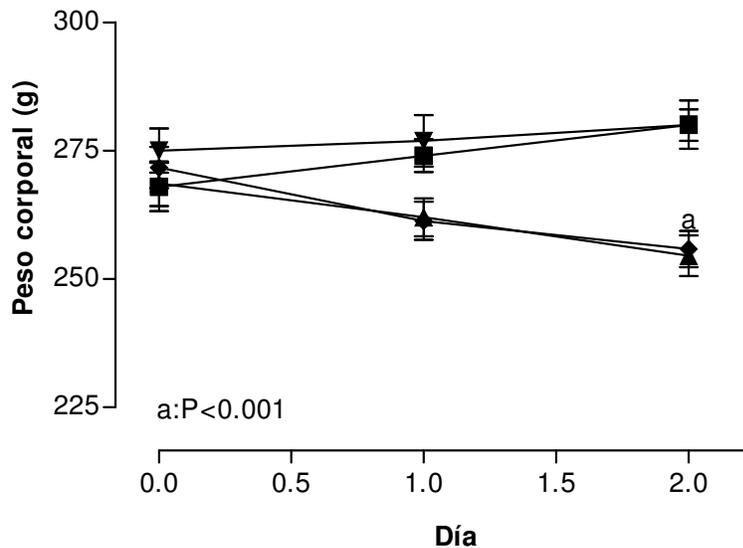


Figura 5. Evaluación del efecto protector del EAE en el daño renal inducido por CF (100 mg/kg). Peso corporal de ratas. Grupos: CT (■), CF (▲), EAE (▼), CF+EAE (◆). Promedio \pm EEM. n = 4-15. a: $P < 0.05$ vs CT.

En la figura 5, correspondiente al peso corporal de los sujetos experimentales, se observa que los tratados con CF y CF+EAE tuvieron una tendencia a disminuir conforme transcurrió el tiempo y que en el día 2 existe una diferencia estadística entre estos grupos y el grupo CT que tuvo una tendencia a aumentar.

En los resultados obtenidos en estos últimos protocolos el daño renal inducido por la CF se hizo muy evidente, ya que en todos los parámetros medidos existió diferencia estadística al comparar al grupo CF con el grupo CT. Esto nos sirvió para hacer una adecuada determinación del efecto protector del EAE en la IRA inducida por CF.

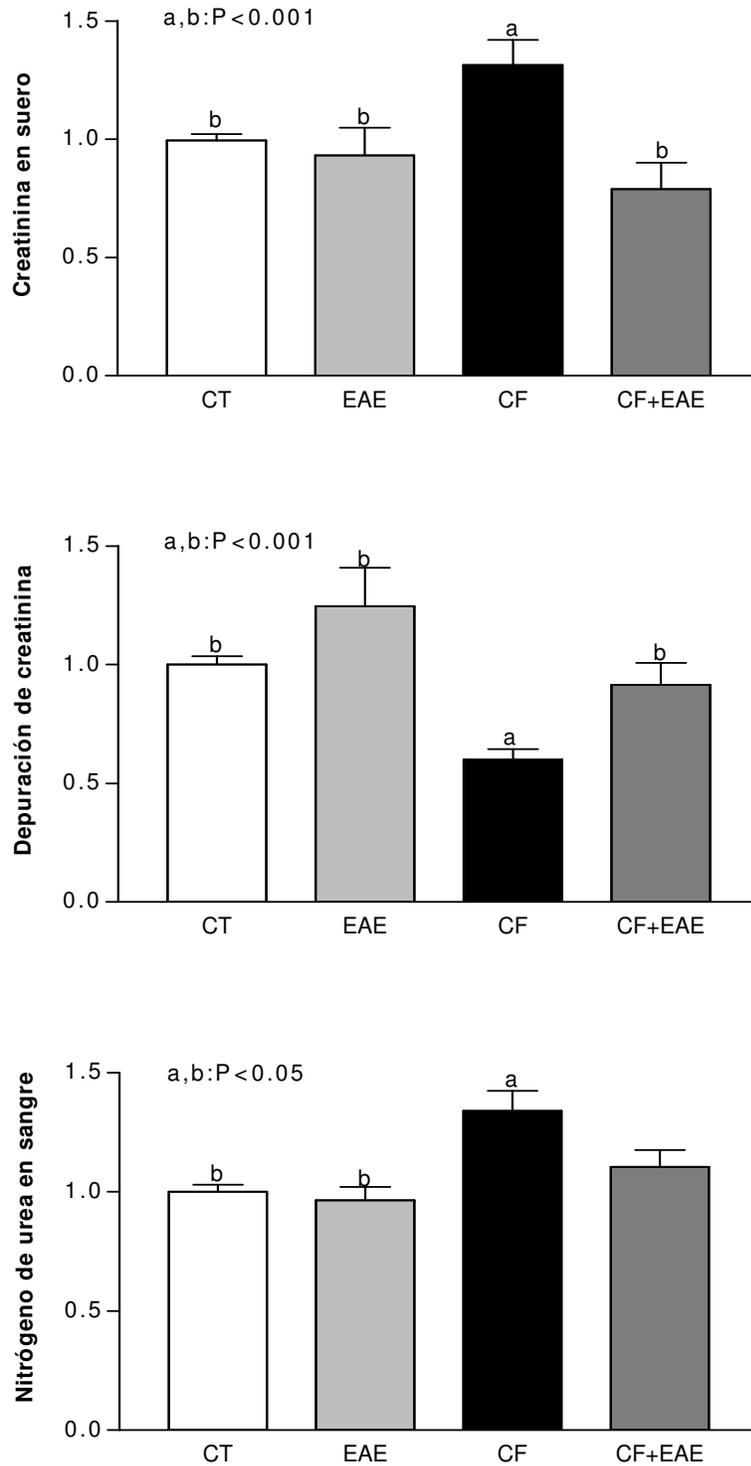


Figura 6. Evaluación del efecto protector del EAE en el daño renal inducido por CF=100 mg/kg. Marcadores de daño glomerular. Promedio \pm EEM. n = 4-32. a: $P < 0.05$ vs CT; b: $P < 0.05$ vs CF.

Respecto a CS; el grupo CT y EAE mostraron niveles de creatinina similares, lo contrario al grupo tratado con la CF, en donde se observó un aumento significativo en los valores de CS ($P < 0.001$). Este aumento pudo ser prevenido totalmente por la administración del EAE; como se muestra en el grupo CF+EAE, donde los valores de CS se mantuvieron al mismo nivel que los del grupo CT.

En el caso de DC, los valores de EAE son mayores que los del grupo CT. Sin embargo; hay que hacer notar que la dispersión de los datos es mayor que en el grupo CT, por lo que no existe diferencia entre ellos. Así mismo, se hizo evidente el daño inducido por el fármaco, ya que los niveles de depuración disminuyeron aproximadamente a la mitad de los del grupo CT ($P < 0.001$). Lo que concuerda con lo obtenido en la gráfica de CS, ya que a menores niveles de depuración, mayores niveles de creatinina. El daño por la CF pudo prevenirse de manera total en el grupo tratado con el EAE.

En cuanto a BUN; los niveles de CT y EAE presentan estrecha similitud, lo que contrasta con el grupo CF, en donde los niveles de BUN aumentaron y son diferentes con respecto al grupo CT ($P < 0.001$). A diferencia de los otros dos parámetros evaluados; el aumento de BUN solo pudo prevenirse de parcial; ya que aunque los niveles son menores que en los del grupo tratado con el antineoplásico, estos no se mantienen al mismo grado que los del grupo CT.

c) Evaluación del estrés oxidante

La obvia función de los antioxidantes es reaccionar directamente con las ERO, con lo cual se contribuye a disminuir o prevenir el daño generado. Además, al evitar el aumento del estrés oxidante es posible impedir la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, por tal efecto también se les llama antioxidantes.

Por los antecedentes antes mencionados se sabe que las ERO desempeñan un importante papel en el desarrollo de la IRA. Es por ello que se hizo necesario el evaluar en este trabajo el estrés oxidante mediante la actividad de las enzimas antioxidantes más estudiadas (SOD, GPx, CAT) y un indicador de la oxidación de lípidos (lipoperoxidación).

Actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón

Se observó que la actividad de las enzimas CAT y SOD en el grupo tratado con CF disminuyeron significativamente respecto al grupo CT ($P < 0.05$).

En el caso de la enzima CAT, el grupo tratado previamente con EAE, mantuvo los mismos niveles de actividad que el grupo CT y EAE, cuyos valores fueron semejantes. Por lo que podemos decir que el EAE tiene un efecto protector total en cuanto a la actividad enzimática de CAT en el modelo de nefrotoxicidad inducida por CF.

Para la enzima SOD; se observó que los niveles en la actividad del grupo EAE fueron similares a los del grupo CT, disminuyendo en el grupo tratado con CF. Esta disminución fue prevenida por el EAE, aunque solo de manera parcial, ya que la actividad de la enzima no se mantuvo al mismo grado que el grupo CT.

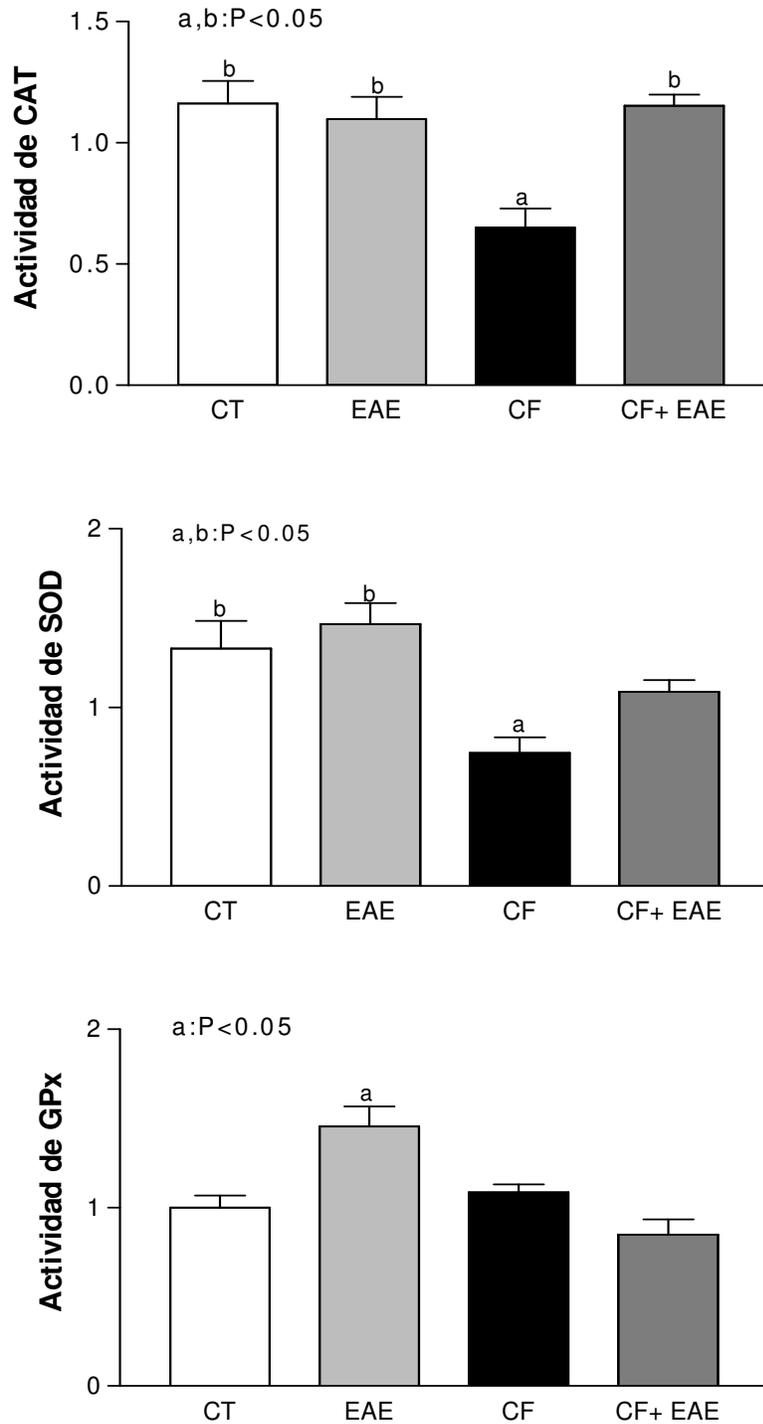


Figura 7. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón. Resultados de las actividades de CAT, SOD y GPx en IRA inducida por CF (100 mg/kg). Promedio \pm EEM. n = 4-6. a: $P < 0.05$ vs CT; b: $P < 0.05$ vs CF.

En cuanto a la actividad de la enzima GPx no se observó una diferencia entre el grupo CT y el grupo CF; incluso la actividad de la enzima fue ligeramente mayor en los grupos tratados con el antineoplásico. Por lo que podemos deducir que el organismo quizá esté aumentando la actividad de esta enzima para contrarrestar el daño producido por el fármaco pero no lo logra hacer de manera significativa. Donde si se observó diferencia fue entre los grupos CT y EAE, en los cuales se observa como la actividad de la enzima es favorecida en el grupo tratado con el antioxidante. En el grupo CF+EAE los niveles de la actividad son semejantes al grupo CT.

Marcador de estrés oxidante

Como marcador de estrés oxidante se evaluó al malondialdehído (MDA), producto formado a consecuencia de la interacción de radicales libres con moléculas celulares, específicamente del radical hidroxilo con los lípidos, proceso al que se le conoce como lipoperoxidación

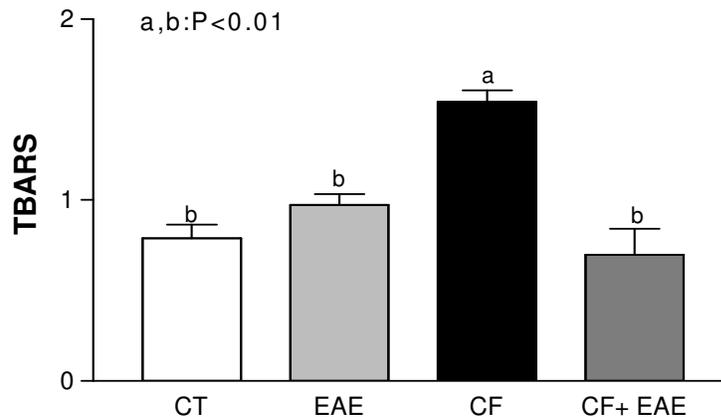


Figura 8. Marcador de estrés oxidante. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en el modelo de IRA inducida por CF (100mg/kg) Promedio ± EEM. n = 4-6. a: $P < 0.05$ vs CT; b: $P < 0.05$ vs CF.

En cuanto al marcador de estrés oxidante (Figura 8); se observó que el nivel de TBARS en el grupo CF aumenta aproximadamente al doble respecto al grupo CT ($P < 0.01$). Esto era de esperarse, ya que diversos estudios han reportado la importancia de las ERO en el desarrollo de la IRA. Así mismo, se observó que la oxidación lipídica pudo ser prevenida por el tratamiento con EAE, conservando el nivel de TBARS al mismo grado que los del grupo CT y EAE, cuyos valores fueron similares. Debido a que el MDA es un indicador indirecto de la lipoperoxidación, podemos deducir que esta reacción se está llevando de manera muy activa en los grupos tratados con el fármaco. Con estos resultados podemos decir que el EAE ejerce una protección total en cuanto al estrés oxidante en este modelo de nefrotoxicidad.

Los resultados expuestos en este trabajo demuestran que el EAE posee un efecto protector preventivo en el modelo de IRA inducida por CF. Esta protección es parcial; no podemos hablar de protección total, porque no todos los parámetros evaluados son iguales a los niveles considerados como normales (datos del grupo CT).

10. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se logró establecer el modelo de IRA en ratas utilizando CF como inductor.
 - Se determinó que una dosis de CF=100 mg/kg es la indicada para estudiar el modelo de IRA inducido por CF en ratas macho cepa Wistar.
 - Se determinó que el lapso de tiempo en que el daño renal inducido por CF alcanza sus niveles más altos, es a las 48 horas después de la administración diaria del antineoplásico.
 - Se observó que de los parámetros que evalúan función tubular, solo aumentan los niveles de PT. Estando mayoritariamente presentes proteínas de alto peso molecular, indicando daño glomerular.
 - Se determinó que el EAE previene totalmente el aumento de CS y la disminución de DC; además, previene parcialmente el aumento de BUN ocasionados por la administración de CF.
 - Se determinó que la disminución de la actividad enzimática de CAT como consecuencia de la IRA por CF, es prevenida totalmente por la administración de EAE. En el caso de la disminución de la actividad de la enzima SOD solo es prevenida de manera parcial.
 - EAE es capaz de prevenir totalmente el aumento de TBARS ocasionado por la administración del antineoplásico.
-

11. CONCLUSIÓN

- El extracto de ajo envejecido es capaz de evitar parcialmente el daño funcional y el estrés oxidante renal que produce la ciclofosfamida.
-

12. REFERENCIAS

1. Abraham, P., Sugumar, E., & Indirani, K. (2007). Effect of cyclophosphamide treatment on selected lysosomal enzymes in the kidney of rats. *Experimental and toxicologic pathology*, 59, 143-149.
 2. Aebi, H. (1982). Catalase, In: Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie.
 3. Ahmad, MS., Pischetsrieder, M., & Ahmed, N. (2007). Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur J Pharmacol*, 561, 32-8.
 4. Allison, G., Lowe, G., & Rahman, K. (2006). Aged garlic extract and its constituents inhibit platelet aggregation through multiple mechanisms. *J Nutr*, 136, S782-8.
 5. Armstrong, D., & Browne, R. (1994). The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, 366, 43-58.
 6. Aruoma, O., Halliwell, I. B., Gajewski, E., & Dizdaroglu, M. (1991). Copper-iron dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *J Biochem*, 273, 2601-2604.
 7. Barrera, D., Maldonado, PD., Medina-Campos, ON., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., & Pedraza-Chaverrí, J. (2003). HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K₂Cr₂O₇. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 1390-1398.
 8. Baud, L., & Ardaillou, R. (1986). Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol*, 251, F765-F776.
 9. Baud, L., & Ardaillou, R. (1993). Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull*, 49, 621-629.
 10. Berginc, K., Zakelj, S., Ursic, D., & Kristl, A. (2009). Aged garlic extract stimulates p-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 mediated effluxes. *Biol Pharm Bull*, 32, 694-699.
-

11. Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr*, *131*, 1010S-5S.
 12. Brenner, B. (2005). *El riñón. Tratado de nefrología*. USA: Elsevier. 3-60.
 13. Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., Amadori, D., Avellini, C., Bianchi, S., Biserni, R. & Cipriani, F. (1989). A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int J Cancer*, *44*, 611-616.
 14. Burk, RF. (1990). Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmacol Ther*, *45*, 383-385.
 15. Cheng, L., Kellogg, EW., & Packer, L. (1981). Photoinactivation of catalase. *Photochem Photobiol*, *34*, 125-129.
 16. Efendy, JL., Simmons, DL., Campbell, GR., & Campbell, JH. (1997). The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *132*, 37-42.
 17. Farombi, EO., & Ekor, M. (2006). Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*, *44*, 1443-8.
 18. Fong, KL., MacCay, PB. & Poyer, JL. (1976). Evidence for superoxide-dependent reduction of Fe³⁺ and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation. *Chem Biol Interact*, *15*, 77-89.
 19. Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., & Seki, T. A. (2008). Thermostability of allicin determined by chemical and biological assays. *Biosci Biotechnol Biochem*, *72*, 2877-2883.
 20. García, L., & Sánchez-Muniz, F. (2000). Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *ALAN*, *50*.
 21. Gibson, D., Hawrylko, J., & McCay, B. (1985). GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids*, *20*, 704-711.
 22. Grisham, M. (1999). Nitric oxide. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am L Physiol*, *276*, G315-21.
 23. Halliwell, B. (1995). *Antioxidants: Elixirs of life or tonics for tired sheep?* The Biochemist, 3-6.
-

24. Heinz, V. (1983). *Renal function: Mechanism Preserving Fluid and Solute Balance in Health*. USA: Little, Brown and Company.
 25. Hernando, L. (2003). *Nefrología clínica*. España: Editorial Médica Panamericana. 3-9, 19-34
 26. Ishikawa, H., Saeki, T., Otani, T., Suzuki, T., & Shimosuma, K. (2009). Aged garlic extract prevents a decline of NK cell number and activity in patients with advanced cancer. *J Nutr*, 136, 816S-820S.
 27. Janero, D. (1998). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 515-540.
 28. Jung, K., Priem, F., Klotzek, S., Becker, S., & Henke, W. (1991). Methods compared for determining activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme*, 45, 215-221.
 29. Khan, AU., & Kasha, M. (1994). Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 12365-12367.
 30. Konigsberg, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidante. Aplicaciones médicas. México: El Manual Moderno. 319-327.
 31. Krinsky, NI., & Deneke, SM. (1982). Interaction of oxygen and oxyradicals with carotenoid. *J Natl Cancer Inst*, 69, 205-209.
 32. Lamm, DL., & Riggs, DR. (2001). Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *J Nutr*, 131, 1067S-70S.
 33. Lefevre, G. (1998). Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annals de Biologie Clinique*, 56, 305-319.
 34. Li, JM., Mullen, AM., Yun, S., Wientjes, F., Brouns, GY., Thrasher, AJ., & Shah, AM. (2002). Essential role of the NADPH oxidase subunit p47 (phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Cir Res*, 90, 143-150.
 35. Liochev, S., & Fridovich, I. (1994). The role of O²⁻ in the production of HO in vitro and in vivo. *Free Rad Bio Med*, 16, 29-33.
-

36. Lockwood, T., & Bosmann, H. (1979). The use of urinary N-acetyl-b-glucosaminidase in human renal toxicology. I. Partial biochemical characterization and excretion in humans and release from the isolated perfused rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*, 49, 323-336.
 37. López, M. (2007). El ajo: propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM*, 26, 78-81.
 38. Luo, G., Qi, D., Zheng, Y., Mu, Y., Yan, G., Yang, T., & Shen, J.C. (2001). ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Lett*, 492, 29-32.
 39. Maldonado, P., Barrera, D., Medina-Campos, O., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M., & Pedraza-Chaverri, J. (2003). Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *Life Sciences*, 73, 2543-2556.
 40. Moriguchi, T., Takasugi, N., & Itakura, Y. (2001). The effects of aged garlic extract on peroxidation and the deformability of erythrocytes. *J Nutr*, 131, 1016S-9S.
 41. Nath, K., Haggard, J.J., Croatt, A., Grande, J., Poss, K., & Alam, J. (2000). The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol*, 156, 1527-1535.
 42. Nordberg, J., & Arnér, E. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31, 1287-1312.
 43. Oberley, L., & Spitz, D. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*, 105, 457-464.
 44. Ohnishi, S., & Ohnishi, T. (2001). In vitro effects of aged garlic extract and other nutritional supplements on sickle erythrocytes. *J Nutr*, 131, 1085S-92S.
 45. Ozbek, E., Turkoz, Y., Sahna, E., Ozugurlu, F., Mizrak, B., & Ozbek, M. (2000). Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int*, 85, 742-746.
-

46. Pedraza-Chaverri, J., Cruz, C., Larriva-Sahd, J., Juárez, R., Orozco, H., Hernández-Pando, R., & Tapia, E. (1995). Angiotensin I converting enzyme in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail*, *17*, 365-375.
 47. Pedraza-Chaverri, J., Granados-Silvestre, M., Medina-Campos, O., & Hernández-Pando, R. (1999). Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med*, *27*, 245-253.
 48. Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P., Medina-Campos, O., Olivares-Corichi, I., Granados-Silvestre, M., Hernández-Pando, R., & Ibarra-Rubio, ME. (2000). Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: reation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med*, *29*, 602-611.
 49. Rahman, K. (2001). Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *J. Nutr*, *131*, 977S-9S.
 50. Rehan, A., Johnson, KJ., Wiggins, RC., Kunkel, RG., & Ward, PA. (1984). Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest*, *51*, 396-403.
 51. Rieger, J., Shan, A., & Gidday, J. (2002). Ischemia-Reperfusion injury of retinal endothelium by cyclooxygenase and xanthine oxidase-derived superoxide. *Exp Eye Res*, *74*, 493-501.
 52. Rosenstein, E. (2004). Diccionario de especialidades farmacéuticas. PLM. Francia: Ediciones Thomson/PLM. 1536-1537.
 53. Rovin, B., Wurst, E., & Kohan, D. (1990). Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kydney Int*, *37*, 1509-1514.
 54. Sánchez, L. (1993). Insuficiencia renal aguda. Aspectos clínicos. España: Ediciones Norma. 548-588.
 55. Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, *11*, 173-186.
 56. Schrier, R., Wang, W., Poole, B., & Mitra, A. (2004). Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*, *114*, 598-611.
-

57. Senthilkumar, S., Mahohar, BM., & Babu, MJ. (2006). Effect of squaleno on cyclophosphamide induced toxicity. *Clin Chim Acta*, 364, 335-42.
 58. Steiner, M., & Lin, R. (1998). Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J. Cardiovasc Pharmacol*, 31, 904-8.
 59. Steiner, M., Khan, A., Holbert, D., & Lin, R. (1996). A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effects of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *AM J Clin Nutr*, 64, 866-70.
 60. Sumiyoshi, H. (1997). New pharmaceutical activities of garlic and its constituents. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 110, 93P-7P.
 61. Takano, S., Aramaki, Y., & Tsuchiya, S. (2001). Lipoxygenase may be involved in cationic liposome-induced macrophage apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 116-120.
 62. Ushijima, M., & Sumioka, I. (1997). Effect of garlic and garlic preparations on physiological and psychological stress in mice. *Phytother Res*, 22, 226-230.
 63. Velázquez, M., Prieto, B., & Contreras, R. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*, 75, 36-43.
 64. Wongmekiata, O., & Thamprasertb, K. (2005). Investigating the protective effects of aged garlic extract on cyclosporin-induced nephrotoxicity in rats. *Blackwell Publishing*, 555-562.
 65. Yagi, K. (1998). Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, 108, 101-106.
 66. You, W., & Blot, W. (1988). Diet and high risk of stomach cancer in Shandong, China. *Cancer Res*, 48, 3518-3523.
 67. Yu, BP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74, 139-162.
 68. Zanón, V. (2008). Estrés oxidante en el glaucoma primario de ángulo abierto. Prevención de la ceguera por glaucoma. *Servei de Publicacions*, 27-30.
-

ANEXOS

Método de Lowry

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert Beer. Este método consta de dos etapas:

1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. Las absorbancias de las muestras se leen en el espectrofotómetro a 580 nm. Anterior a esto se realiza una curva patrón de albúmina sérica bovina.

Electroforesis

Método en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada, con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas de proteínas. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y bis-acrilamida, en una reacción iniciada por la tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato de amonio; el cual activa al TEMED, que a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

La electroforesis termina cuando se ha producido la máxima separación de los componentes de la muestra, pero sin sobrepasar los límites del soporte. Para evitar que se sobrepasen estos límites, se utilizan los marcadores electroforéticos que son moléculas coloreadas con una movilidad electroforética superior a cualquier componente de la muestra. Una vez acabada la electroforesis, se procede a la etapa de tinción. El soporte se retira de la cubeta y se sumerge en un recipiente que contiene una disolución de un colorante que se une de manera específica a los componentes de la muestra.