



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL EXTRACTO DE AJO  
ENVEJECIDO EN LA NEFROTOXICIDAD  
POR METOTREXATO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A:

**TANIA GABRIELA PALACIOS PINEDA**



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El jurado asignado:

**PRESIDENTE:** Perla Carolina Castañeda López

**VOCAL:** José Pedraza Chaverrí

**SECRETARIO:** Diana Barrera Oviedo

**1er. SUPLENTE:** Alejandro Ortiz Osornio

**2do. SUPLENTE:** Ma. Eva González Trujano

Sitio donde se desarrolló el tema:

Edificio de Investigación, 6° piso, Laboratorio 5, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, México DF.

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

**Asesora:** Dra. Diana Barrera Oviedo

**Sustentante:** Tania Gabriela Palacios Pineda

## **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 Dra. Diana Barrera Oviedo, por relacionarse en cuestiones laborales y ser más que una asesora, por compartir sus conocimientos, consejos y experiencias; gracias por su apoyo y preocupación en mis asuntos personales, por permitirme ver esa gran persona que admiro y respeto mucho, gracias Diana....

Gracias a todo el equipo de laboratorio: Gaby, Claudia, Oscar, Maricela, por haberle dado ese mezcla de responsabilidad, convivencia, alegría y diversión durante mi estancia en el laboratorio, a Mariel por haber sido mi equipo de trabajado en la mayor parte de elaboración de este proyecto, a Chio por su apoyo compañía y sobre todo por los años de amistad. Grax Amix por soportarme y aguantar mis caprichos de niña bipolar jeje.

Gracias a mis amigos de otras facultades, que cuando llega a platicarles de mis experimentos con ratas y conejos, no tenían ni la más mínima idea de lo que les decía, pero aun así me escuchaban con interés y atención jiji procurando entender lo que les decía.

También, para no olvidar a nadie, quiero agradecer a **todas** aquellas personas que en algún momento de mi estancia en la universidad llegaron a formar parte de mi vida, haciéndola diferente y especial; a las personas que supieron valorar la amistad y en especial a aquellas que no lo hicieron jaja por que gracias a ellas forme parte de mi carácter y me enseñaron a dar valor a lo bueno de la vida y luchar por lo que realmente vale la pena luchar.

Y para cerrar con broche azul y oro, a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química, mi segundo hogar, por permitirme ser orgullosamente universitaria Puma.

## **Dedicatorias**

Con todo mi amor a mis padres; que me no solo me trajeron a este mundo, sino que también me dieron su amor, cariño, apoyo, confianza, comprensión, por los valores inculcados y por el sustento económico jiji gracias por la vida, por la risa, por la paz y por la calma, gracias por amarme y dejar que los ame.

A mis hermanos; Juan Carlos, Daniel, Liliana y Guadalupe, que vivieron a mi lado las experiencias de estudiar esta maravillosa carrera, que me apoyaron en todo momento y me alentaban a seguir adelante, gracias por todo su amor y sobre todo por ser parte de mi mundo.

A mis cuñados que forman parte de esta gran familia, a mis 5 sobrinos que me distraían cuando llegaba estresada a casa, espero que cuando sean grandes entiendan algo de lo que escribí aquí jiji y se den cuenta lo grandioso que es tener una tesis que presumir 😊.

A todos mis primos, primas y tías, que esperan esos medicamentos milagrosos que curan todo y dan belleza eterna jajajajaja.

En general, a todas las personas que confiaron en y que lo siguen haciendo, realmente luchare para no defraudarlos.

# Índice

## Resumen

1. Introducción	1
1.1. El riñón	1
1.1.1. Morfología y fisiología renal	1
1.1.2. Funciones básicas de riñón	5
1.2. Insuficiencia renal aguda (IRA)	6
1.3. Estrés oxidante	7
1.3.1. Especies reactivas de oxígeno(ERO)	7
1.3.1.1. Exógenos	8
1.3.1.2. Endógenos	9
1.3.2. Especies reactivas de nitrógeno (ERN)	11
1.4. Antioxidantes	13
1.4.1. Antioxidantes enzimáticos	13
1.4.2. Antioxidantes no enzimáticos	16
1.4.3. El ajo y sus características	19
1.4.3.1. Extracto de ajo envejecido	21
1.4.3.1.1. Evidencias de las propiedades antioxidantes del ajo	22
1.4.4. Metotrexato	22
1.4.4.1. Descripción	22
1.4.4.2. Mecanismo de acción	23
1.4.4.3. Farmacocinética	24
1.4.4.4. Efectos secundarios	27
2. Justificación	28
3. Objetivo general	29
3.1. Objetivos particulares	29
4. Material y métodos	30
4.1. Animales	30
4.2. Reactivos	30
4.3. Antioxidante (EAE)	30
4.4. Fármaco (MT)	31
4.5. Muestras	31
4.6. Diseño experimental	32

4.6.1. Establecimiento de la dosis de metotrexato para ocasionar daño renal	32
4.6.2. Evaluación del efecto del EAE	33
4.7. Evaluación de la IRA	33
4.7.1. Función tubular	33
4.7.2. Función glomerular	34
4.8. Evaluación del estrés oxidante	36
4.8.1. Marcadores de estrés oxidante	36
4.8.2. Actividad enzimática de enzimas antioxidantes en el riñón	37
4.9. Análisis estadístico	39
5. Resultados y discusión	40
6. Conclusiones	49
7. Bibliografía	50



## Resumen

La insuficiencia renal aguda o nefrotoxicidad se caracteriza por una rápida disminución de la filtración glomerular, lo que ocasiona la acumulación de productos finales del metabolismo, es asintomática y se detecta mediante un perfil bioquímico, que se caracteriza por un aumento en los niveles de creatinina y nitrógeno de urea en plasma (BUN). El aumento en la excreción urinaria de proteínas es evidencia de daño glomerular o tubular. Además se han desarrollado modelos de nefrotoxicidad en los que se han detectado alteraciones en la cantidad y actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx.

El metotrexato (MT) se utiliza para tratar ciertos tipos de cáncer de seno, piel, cabeza, cuello y pulmón. El MT también se utiliza para tratar psoriasis severa y artritis reumatoide. Se han encontrado casos donde se desarrolló insuficiencia renal aguda a una dosis alta de metotrexato de sodio. Por otro lado, en diversos estudios se han descrito el efecto protector del extracto de ajo envejecido (EAE) en diferentes modelos experimentales asociados con el estrés oxidante.

Por ello, en este trabajo nos propusimos evaluar el efecto de la administración del EAE contra la nefrotoxicidad inducida con metotrexato. Se determinó que el MT inducía nefrotoxicidad a una dosis de 100 mg/kg y que el EAE evitó el daño renal medido mediante niveles de creatinina, BUN y depuración de creatinina. El MT disminuye la actividad de CAT y el EAE evita dicha disminución.

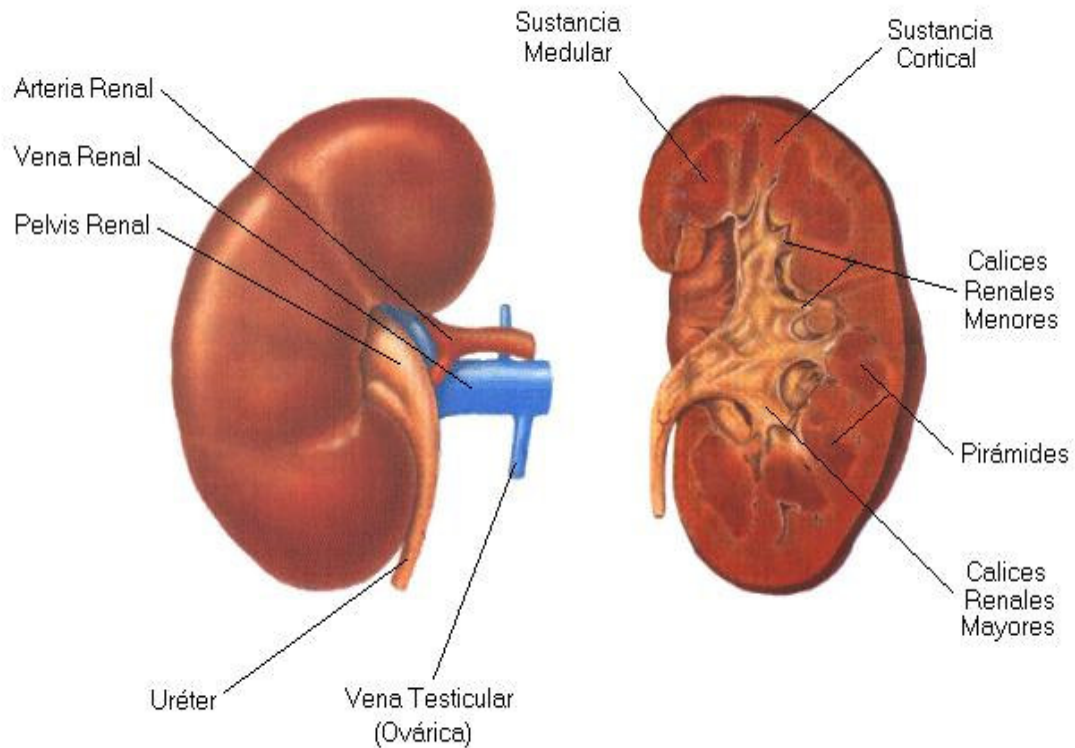
Por tanto, el EAE logró prevenir totalmente la nefrotoxicidad inducida por la administración de MT, el cual provocó un daño a nivel glomerular, así como la inducción de estrés oxidante, donde el efecto del EAE sólo fue parcial.

## 1. Introducción

### 1.1. EL RIÑÓN

#### 1.1.1. Morfología y fisiología renal

El riñón tiene una estructura oval, es un órgano par y se encuentran ubicados en la región inferior del abdomen y por debajo del hígado. Se encuentran a ambos lados de la columna vertebral, paralelos a la última vértebra torácica y las tres primeras vértebras.



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

En el ser humano el peso de cada uno oscila entre 125 y 170 g en el varón y entre 115 y 155 g en la mujer; mide de 11 a 12 cm de longitud, de 5 a 7,5 cm de anchura y de 2,5 a 3 de grosor. En su cara medial o cóncava presenta una hendidura longitudinal llamada hilio renal, el cual conduce a una cavidad que se conoce con el nombre de seno renal, en cuyo interior se observan los vasos renales, cálices y parte de la pelvis, todo ello rodeado por tejido adiposo. Cada riñón está irrigado por una única arteria renal, la cual penetra en la región hiliar y suele dividirse en una rama anterior y otra posterior.

El riñón está recubierto de una membrana blanca y delgada que se denomina cápsula fibrosa, de menos de 1 mm de grosor, la cual se desprende con facilidad en el riñón normal; por debajo de la cápsula fibrosa se encuentra la corteza renal, siendo mayoritariamente la zona externa, en donde se inicia la producción de orina.

La corteza es color marrón, aspecto granuloso y aproximadamente 1 cm, debido a la presencia de los glomérulos y de los túbulos contorneados, contiene pequeños vasos sanguíneos renales y parte de las nefronas. Debajo de la corteza se encuentra la médula, siendo ésta una estructura firme y resistente, color pálido con zonas de aspecto estriado llamadas pirámides de Malpighi, cuyas bases se dirigen hacia fuera en contacto con la corteza y cuyos vértices o papilas renales se orientan hacia el hilio renal conectado con la porción inicial del sistema excretor llamados cálices.

La médula posee dos zonas, su aspecto se debe a la porción ascendente de la asa de Henle y de los túbulos colectores; contiene más vasculatura renal y parte de las nefronas, además en ésta área se lleva a cabo la función de concentración de orina y conservación de agua (**Anderson y Cockayne, 1995**).

### **Nefrona**

La nefrona es la unidad funcional del riñón, que se encarga de la formación de la orina. El cuerpo humano presenta entre 400,000 a 1,200,000 nefronas a diferencia de la rata que contiene entre 30,000 a 34,000 nefronas

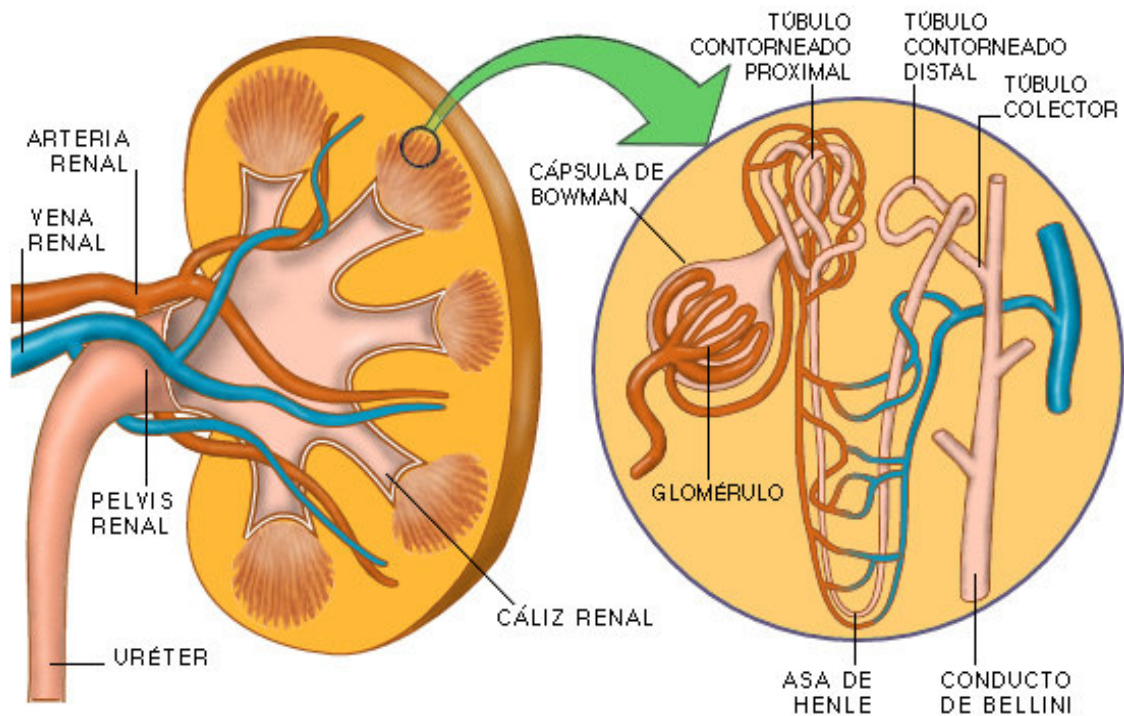
aproximadamente, donde cada nefrona actúa de manera independiente. El extremo proximal de la nefrona está constituido por el corpúsculo renal, que comprende un ovillo vascular o glomérulo invaginado en una estructura parecida a un saco denominada cápsula de Bowman. Esta cápsula glomerular es la expansión inicial del sistema tubular, la cual recibe el filtrado (Esquema 2).

Además de acuerdo a la localización de las nefronas y de la longitud de los túbulos hay nefronas yuxtamedulares, más profundas y nefronas corticales, cortas. La interacción de la nefrona con la vasculatura permite que los riñones efectúen las cuatro funciones fundamentales para preservar la homeostasis del organismo como lo son: filtración, reabsorción, secreción y excreción (**Anderson y Cockayne, 1995**).

### **Glomérulo**

El glomérulo es donde se lleva a cabo la filtración de pequeñas moléculas, agua o iones del plasma sanguíneo, localizándose en la corteza renal, constituido por una red de hasta 50 capilares paralelos cubiertos de células epiteliales, células que se encuentran dentro de una envoltura externa en forma de copa llamada cápsula de Bowman.

La cápsula de Bowman actúa como recipiente del filtrado del plasma y da origen a una porción tubular (**Anderson y Cockayne, 1995**). Gran parte del volumen de agua y solutos filtrados por el glomérulo son reabsorbidos en el túbulo renal, si no fuera así, y teniendo en cuenta el filtrado glomerular normal, el volumen diario de orina excretada podría llegar a 160 L, en lugar del litro y medio habitual.



**Esquema 2.** Estructura interna del riñón

### **Porción tubular**

En las células tubulares, como en la mayoría de las del organismo, el transporte de sustancias puede efectuarse por mecanismos activos o pasivos. En el primer caso el proceso consume energía, en el segundo no, efectuándose el transporte gracias a la existencia de un gradiente de potencial químico o electroquímico; no obstante la creación de este gradiente, puede precisar un transporte activo previo. Por uno u otro de estos mecanismos, la mayor parte del agua y sustancias disueltas que se filtran por el glomérulo son reabsorbidas y pasan a los capilares peritubulares y de esta forma nuevamente al torrente sanguíneo. Así como existe la capacidad de reabsorber sustancias, el túbulo renal también es capaz de secretarlas pasando desde el torrente sanguíneo a la luz tubular.

En la porción tubular se lleva a cabo la reabsorción, que permite al organismo recuperar la mayor parte de los líquidos a través de procesos de difusión, ósmosis y transporte activo; la secreción, permite el paso directo de la

circulación a los túbulos y la excreción que consisten en la evacuación total de una sustancia del riñón. La porción tubular que se encuentra en la médula renal está constituida por una primera porción denominada túbulo contorneado proximal que se encuentra recubierto de células que son sumamente permeables al paso de agua, sodio, glucosa, bicarbonato y aminoácidos, el 75% de las sustancias que han sido filtradas se reabsorben pasivamente en este túbulo.

El siguiente segmento de la nefrona es el asa de Henle que está constituida por un miembro descendente, una horquilla y el miembro ascendente. En el asa de Henle se reabsorbe 25% del sodio y 15% del agua filtrada. Ambos miembros del asa de Henle son paralelos entre sí, ambos están rodeados de vasculatura renal y son permeables de forma selectiva al desplazamiento de sodio, urea, potasio y agua. Otra porción de la nefrona es el túbulo contorneado distal, que se ubica en la corteza renal aquí se secreta potasio e hidrogeniones que contribuyen a la acidificación de la orina, se reabsorben fracciones variables del 10% de sodio y 15% de agua restantes del filtrado glomerular, y desemboca en el conducto colector y en la pelvis renal (**Anderson y Cockayne, 1995**).

### **1.1.2. Funciones básicas del riñón**

Para llevar a cabo todas sus funciones el riñón dispone de un abundante flujo sanguíneo, su irrigación depende de la arteria renal, rama de la aorta abdominal. La arteria renal se divide en 4 a 5 arterias interlobales, las cuales se ramifican en arterias arqueadas y éstas, a su vez, forman las arterias interlobulillares, de ellas surgen las arteriolas aferentes que forman los glomérulos y que terminan en arteriolas eferentes, las cuales formaran las arterias rectas y las redes peritubulares; desde estas redes capilares surgen las venas que finalmente forman la vena renal que desemboca en la vena cava inferior y así mediante ello poder realizar correctamente sus funciones básicas (**Schrier, 1999**), algunas de ellas son:

- 1) Separar la mayor parte de los productos de excreción metabólica del organismo y sustancias extrañas,

- 2) Participar en la regulación del volumen del líquido extracelular y de la cantidad total del agua en el organismo,
- 3) Controlar el equilibrio ácido-base y la concentración de la mayor parte de los componentes del organismo,
- 4) Tener función endocrina, dado que secretan dos hormonas al torrente sanguíneo, la eritropoyetina, que estimula la formación de eritrocitos en la médula ósea y la renina, de importancia en la regulación de la presión arterial **(Geneser, 2000)**,
- 5) Finalmente, los riñones sintetizan glucosa a partir de los aminoácidos y de otros precursores en situaciones de ayuno prolongado **(Guyton, 1997)**.

## **1.2. INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)**

La IRA es un síndrome reversible caracterizado por una rápida disminución de la filtración glomerular, ocasionando la acumulación de productos finales del metabolismo (compuestos nitrogenados) y alteración de la homeostasis de agua y electrolitos **(Guyton, 1997; Burton, 1981)**.

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

1. Causas pre-renales: provoca la disminución del flujo sanguíneo desencadenando efectos sobre la filtración glomerular; pero las estructuras renales se conservan íntegras. Puede ser originado por un choque hipovolémico, transfusional, anafiláctico, séptico o traumático.
2. Causas renales: debido a la inflamación aguda que produce una lesión orgánica de las estructuras renales. Es causada por agentes nefrotóxicos, depósitos intratubulares de pigmentos, glomerulonefritis y nefropatía lúpica, entre otros.
3. Causas post-renales: se debe a una obstrucción de uréter, vejiga, neoplasmas o procesos malignos e hipertrofia prostática entre otros, además se afecta el flujo urinario.

4. Por lo tanto, la insuficiencia renal crónica, así como aguda de diversas etiologías está asociada al estrés oxidante (**Chirino, 2006**).

### 1.3. ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante se define como una situación de desequilibrio causado por un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes(**Sies y Mehlhorn, 1986**). 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.

Sin embargo, dista mucho de parecer un equilibrio estático, debido a que los oxidantes son producidos de manera continua como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidante; así como los antioxidantes que se encuentran en constante relación con ellos; también pueden variar por cambios en su consumo, en el caso de los exógenos, o en su síntesis y degradación en el caso de los endógenos. En las condiciones de estrés oxidante, los oxidantes aumentan o los antioxidantes disminuyen en forma progresiva y continua, incluyendo respuestas adaptativas de los antioxidantes, lo que le confiere elasticidad y reversibilidad a la situación biológica (**Konigsberg, 2008**).

#### 1.3.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Son moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno en los sistemas biológicos siendo sintetizadas y degradadas por todos los organismos aerobios (**Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006**). Se ha demostrado un papel tóxico del oxígeno, el cual se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), su toxicidad radica en que a partir de ellas se generan especies mucho más reactivas como el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) y el oxígeno en singulete ( $^1\text{O}_2$ ). Cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se reduce con metales divalentes como el hierro y el cobre aceptando un electrón no apareado se produce el  $\text{HO}^\bullet$  por la reacción de Fenton. Por otra parte, el  $^1\text{O}_2$  se genera por la excitación



del dioxígeno, la dismutación espontánea de  $O_2^{\bullet-}$  y la descomposición de  $H_2O_2$ . El  $^1O_2$  y el  $HO^{\bullet}$  reaccionan rápidamente con DNA, proteínas y lípidos produciendo daños y cambios estructurales en las células que muchas veces son irreversibles.

Entre las especies químicas derivadas del oxígeno que son más reactivas que éste en su forma diatómica  $^1O_2$ , incluyen tanto a radicales como a productos no radicales; un radical libre (RL) se define como cualquier especie química ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados (**Halliwell y Gutteridge, 2006**) ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura hemolítica de una molécula (**Symons, 1991**).

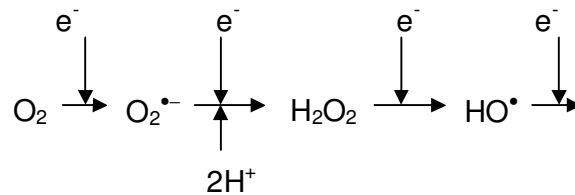
La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva. Por lo tanto a concentraciones elevadas estas especies son tóxicas para la célula y los tejidos (**Bastet *et al.*, 1982**). Los RL's pueden ser de origen endógeno o exógeno (**Freeman y Crapo, 1996; Frei, 1994**), a continuación se mencionan algunos de ellos.

#### 1.3.1.1. Exógenos

- a) Fármacos como cisplatino, ciclosporina y gentamicina (**Denoet *et al.*, 1982; Maldonado et al., 2005; Santos et al., 2007**).
- b) Radiaciones electromagnéticas (**Bickers y Athar, 2006**).
- c) Contaminantes ambientales, pesticidas, humo del tabaco, hidrocarburos aromáticos y solventes (**Mancuso et al., 2007**).

### 1.3.1.2. Endógenos

- a) La cadena de transporte electrónico mitocondrial donde ocurre la transferencia de electrones conocida como reducción univalente del oxígeno.



**Reacción 1.** Reducción univalente del oxígeno

- b) La xantinaoxidorreductasa (XOR) puede existir en 2 formas funcionalmente distintas: xantina deshidrogenasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD<sup>+</sup>) y que produce nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y urato; ésta puede transformarse en xantina oxidasa, dependiente de oxígeno originando O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Loftuset *al.*, 2007).
- c) Los fagocitos activados poseen diversas enzimas como NADPH oxidasa y sintasa que generan ERO que matan a los microorganismos extraños que ingresan al organismo (Babior, 1978).

Considerando la importancia de las ERO se presentan las características principales y producción biológica de las siguientes especies:

#### **Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)**

Se genera en muchas reacciones de auto-oxidación y por la cadena transportadora de electrones. La producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ocurre principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y del complejo I (NADH-coenzima Q reductasa) (Hansberg, 2002; Konigsberg, 2008).

Esta especie participa en la descarga bactericida de las células fagocíticas activadas por partículas extrañas en los eventos inmunológicos. Al activarse estas células la NADPH oxidasa reduce parcialmente el oxígeno y produce

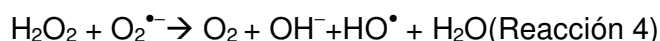
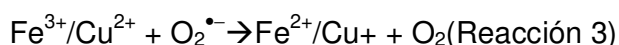
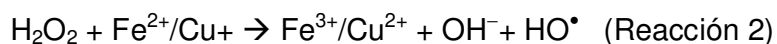
$O_2^{\bullet-}$ , asimismo la xantina oxidasa (XO) también es capaz de reducir el oxígeno para producir  $O_2^{\bullet-}$  (**Cárdenas-Rodríguez and Pedraza-Chaverri, 2006**).

### **Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )**

El  $H_2O_2$  es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas las monooxigenasas y las oxidasas (xantina oxidasa, oxidasas de aminoácidos, hexosas y fenoles), también por la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  o por la reducción directa de  $O_2$ . El  $H_2O_2$  no es un radical libre por lo que es poco reactivo; sin embargo, puede difundir a través de los compartimentos celulares, donde puede encontrar las condiciones para generar especies más tóxicas o inactivar enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o la fructosa-1,6-bifosfatasa (**Hansberg, 2002**).

### **Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )**

El  $OH^{\bullet}$  es una especie con una vida media corta y la más reactiva, se genera por la lisis del  $H_2O$  o del  $H_2O_2$  por acción de las radiaciones ionizantes, derivados de la reducción del  $H_2O_2$  por iones de metales de transición; ésta reacción se conoce como reacción (2) de Fenton, a partir de  $H_2O_2$  en presencia de metales como hierro o cobre (**Konigsberg, 2008; Yu, 1994**).



Los iones metálicos se regeneran gracias al  $O_2^{\bullet-}$  (Reacción 3). Por su parte al resultado de la suma de las reacciones 2 y 3 se le conoce como reacción (4) de Haber-Weiss, en la que el  $O_2^{\bullet-}$  reacciona con el  $H_2O_2$  en presencia de un metal (regularmente  $Fe^{2+}$ ), produciendo  $OH^{\bullet}$ ,  $H_2O$ , y  $O_2$ . El  $OH^{\bullet}$  es extremadamente reactivo, ya que ataca a la mayoría de los componentes celulares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos (**Cheeseman y Slater, 1993; Breen y Murphy, 1995; Wardman y Candejas, 1996; Frei, 1994; Sawyer, 1988**).

### **Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )**

El  $^1\text{O}_2$  se origina cuando uno de los electrones libres del  $\text{O}_2$  cambia de giro al captar energía, teniendo ahora giros opuestos los electrones libres se aparean inmediatamente. Derivado de ello hay dos especies de oxígeno singlete, la sigma ( $\Sigma$ ) que es un radical libre muy inestable y la delta ( $\Delta$ ) que no es un radical libre pero tiene importancia en los sistemas biológicos al ser muy reactivo sobre todo con los lípidos de membrana lo que produce radical peroxilo (Konigsberg, 2008).

La formación de  $^1\text{O}_2$  se lleva a cabo por fagocitos activados (Eberhardt, 2001), como resultado de la acción de la luz sobre el  $\text{O}_2$  en reacciones de oxidación de diversas especies o en el transcurso de algunas reacciones enzimáticas; además puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas (Zhouet *al.*, 2006).

### **1.3.2. ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (ERN)**

Además de las ERO, recientemente se ha descubierto que hay otras especies derivadas del nitrógeno y que son importantes en los sistemas biológicos, al igual que en las ERO existen especies radicales como óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), especies no radicales como peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), cloruro de nitrilo ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ), catión nitrosilo ( $\text{NO}^+$ ), anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ), tetróxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ), trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), catión nitronio ( $\text{NO}_2^+$ ) y alquilperoxinitratos ( $\text{ROONO}^-$ ).

Las ERN más estudiadas son el  $\text{NO}^\bullet$ , el  $\text{ONOO}^-$  y el  $\text{NO}_2^\bullet$ ; siendo las dos primeras las de mayor importancia en los sistemas biológicos, ya que el  $\text{NO}_2^\bullet$  ha recibido atención previa debido a su importancia como contaminante ambiental (Augustoet *al.*, 2002; Konigsberg, 2008).

### **Óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ )**

El  $\text{NO}^\bullet$  es un radical que se parece al  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y a semejanza de éste, no es muy reactivo. Pero a diferencia del  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el  $\text{NO}^\bullet$  no tiene carga y por ello pasa con

facilidad las membranas celulares y se difunde (**Konigsberg, 2008**). El NO<sup>•</sup> regula el flujo sanguíneo, inhibe la agregación plaquetaria, contribuye a la defensa inmunitaria, actúa como neurotransmisor y posee acción antiinflamatoria.

El NO<sup>•</sup> a concentraciones elevadas genera metabolitos que pueden reaccionar con el O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup> inactivando enzimas y reaccionando con ácidos nucleicos que dan lugar a mutaciones y roturas del ADN (**Bredt et al., 1991; Lamas et al., 1992; Moncada et al., 1991; Bush et al., 1992; Czapski y Goldstein, 1995**). En el aire reacciona con el O<sub>2</sub> generando NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, un gas mucho más reactivo que el NO<sup>•</sup> (**Konigsberg, 2008**).

### **Dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>)**

El NO<sub>2</sub><sup>•</sup> es un RL contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO<sup>•</sup> atmosférico (**Postlethwait, 1995**). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (**Halliwell, 1994**). Reacciona con el radical de tirosina que se encuentra en algunas proteínas, por ejemplo, en el sitio activo de la ribonucleósido difosfororeductasa o de la prostaglandina H<sub>2</sub> sintasa-1 (**Konigsberg, 2008**).

### **Peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)**

El peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) se genera mediante la reacción del NO<sup>•</sup> con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, cuando el NO<sup>•</sup> se produce en grandes cantidades, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reacciona más rápidamente con él, que con su enzima detoxificadora la superóxido dismutasa, dando lugar a la formación de ONOO<sup>-</sup>, este agente oxidante es responsable de los efectos dañinos del NO<sup>•</sup> sobre las principales biomoléculas, ya que causa peroxidación lipídica, es decir daño a proteínas por nitración de los residuos de tirosina, oxidación y nitrosilación de grupos sulfhídricos y ruptura del ADN (**Beckman, 1994**).

Las ERO y las ERN se generan de forma continua como parte del metabolismo en los organismos aerobios; algunas de ellas juegan un papel importante dentro de la fisiología celular por ejemplo, como mediadores de señalización

(NO<sup>•</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), como mecanismos de acción frente a las infecciones en el sistema inmunológico en el control de la presión sanguínea (NO<sup>•</sup>), entre otros (**Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006; Turrens, 2003; Gutteridge, 1994**).

Debido al efecto tóxico potencial de las ERO/ERN, el organismo debe mantener en equilibrio su producción y eliminación. Para ello cuenta con sistemas biológicos (enzimáticos y no enzimáticos) que reparan el daño resultante.

#### **1.4. ANTIOXIDANTES**

Debido a que la producción de las ERO ocurre espontáneamente en los organismos aerobios, es necesario la presencia de un sistema de defensa que contrarreste los efectos oxidantes ocasionados por estas especies, por lo que el organismo ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante enzimática y no enzimática, diseñados para protegerse de la acción de las ERO (**Halliwell y Gutteridge, 2001**).

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 (**Velásquez et al., 2004**).

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

##### **1.4.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS**

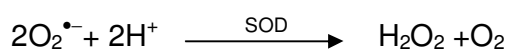
Existen varias enzimas destinadas a convertir las ERO menos reactivas en moléculas inocuas, antes de que promuevan la generación de moléculas más reactivas, capaces de reaccionar y dañar las estructuras celulares (**Wells et al.,**

2005; Mates *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2006; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Estos mecanismos incluyen las siguientes enzimas: superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y sistemas regeneradores de NADPH que previenen la formación de nuevos radicales libres.

### **Superóxidodismutasa.**

La SOD cataliza la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$  (Reacción 5) (Konigsberg, 2008, Massieu, 1999; Aguilera *et al.*, 2007; Yu, 1994). Esto se logra a través de oxidaciones y reducciones sucesivas del metal de transición del sitio activo de la enzima, en un mecanismo de tipo ping-pong (Meier *et al.*, 1998).



Reacción 5. Dismutación del anión superóxido

La SOD es considerada la primera enzima de defensa antioxidante, ya que previene la formación del  $OH^{\bullet}$ , catalizando la reacción de dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  (Zanón, 2008). En humanos existen tres isoformas (Oury *et al.*, 1996; Sandström *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1995), que se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos, todos productos de genes diferentes (Ho *et al.*, 2001) que son:

- a. La SOD mitocondrial, que depende de manganeso (MnSOD), es un homotetrámero (96 kDa) que contiene un átomo de Mn por subunidad, durante la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  el Mn (III) pasa a Mn (II) y regresa nuevamente a Mn (III) (Mac Millan-Crow *et al.*, 1998).
- b. La SOD citosólica, que depende de cobre y zinc (CuZnSOD), es una enzima muy conservada, posee 2 subunidades idénticas de alrededor de 17 kDa cada una; el sitio activo está constituido por un átomo de Cu y uno de Zn unidos por un residuo de histidina, se cree que ésta isoforma tiene una función importante en la

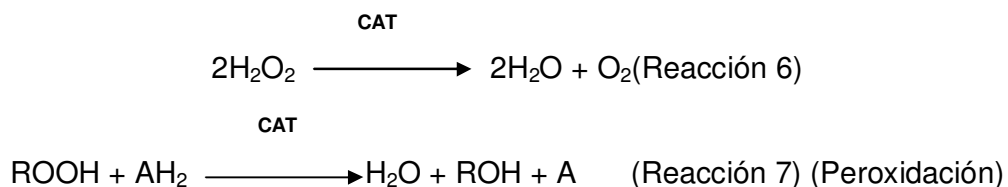
primer línea de defensa antioxidante (**Battistoni et al., 1998; Leahet al., 1998; Stroppolo et al., 1998**).

- c. La SOD extracelular, que también depende de cobre y zinc, es una glucoproteína tetramérica secretora, no se induce por su sustrato u otros oxidantes y su regulación se lleva a cabo de una forma coordinada.

La SOD no es propiamente una enzima detoxificante, ya que el producto de su actividad, el  $H_2O_2$ , es un agente tóxico; sin embargo, la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  es el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación completa de este radical, algunos autores indican que la actividad de esta enzima está encaminada a impedir la inhibición de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa por parte del  $O_2^{\bullet-}$  (**Blum y Fridovich, 1985**). El segundo paso depende de las enzimas que metabolizan el  $H_2O_2$ .

### Catalasa

La CAT es una hemoproteína tetramérica de 240 kDa y cataliza la descomposición del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  (Reacción 6) (**Chenget al., 1981**). Se localiza principalmente en peroxisomas. Con donadores de protones (metanol, etanol, ácido fórmico, etc.) muestra actividad de peroxidasa (Reacción 7) (**Aebi, 1980**).

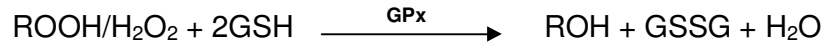


Su tiempo de vida media en la circulación es de 6 a 8 min (**Price et al., 1962**), en mamíferos está presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejido conectivo (**Nakashima et al., 1989**). En la célula se localiza en citosol, mitocondrias y organelos subcelulares como los peroxisomas, existe en los eritrocitos una forma soluble (**Aebi, 1984**).



### Glutación peroxidasa

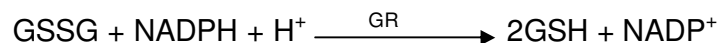
Esta enzima es una proteína tetramérica de 80 kDa que confiere protección a la célula ante un exceso de  $H_2O_2$  y de hidroperóxidos. Estos compuestos son reducidos enzimáticamente usando como cofactor al glutatión reducido (GSH) el cual es oxidado durante la reacción a disulfuro glutatión (GSSG) (Reacción 8) (Yu, 1994). La enzima tiene diversas isoformas entre las que se encuentran la citosólica, la plasmática y la gastrointestinal. El GSH es regenerado a partir del GSSG por medio de la glutatión reductasa como se describe a continuación (Maldonado PD, 2000; Carvajal, 2002). De hecho el metabolismo del GSH es uno de los mecanismos de defensa antioxidante más importante en la célula (Esterbauer *et al.*, 1992; Rikans y Hornbrook, 1997; Grazioliet *al.*, 1998).



Reacción 8. Reacción catalítica de la glutatión peroxidasa.

### Glutatión reductasa

La GR de 107 kDa mantiene el nivel de GSH en la célula. La GR es reducida por el NADPH, formando una semiquinona de FAD, un radical sulfuro y un grupo tiol. La GR reducida reacciona con el GSSG, resultando en un intercambio disulfuro, que produce una molécula de GSH y un complejo  $GR_{red}-SG$  (Reacción 9). Un rearrreglo de electrones que resulta en otro intercambio disulfuro libera al segundo GSH y a la GR oxidada.

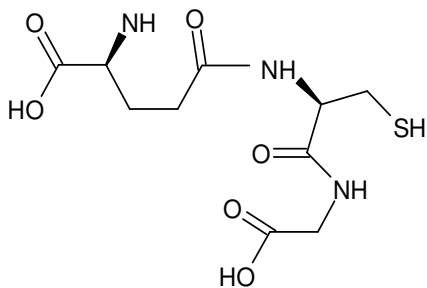


Reacción 9. Reacción de la glutatión reductasa

### 1.4.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Son algunos compuestos que poseen la capacidad de interaccionar directamente con las ERO. Se clasifican en sistemas enzimáticos hidrosolubles y liposolubles (Waringet *al.*, 2003; Halliwell y Gutteridge, 1999; Rahman *et al.*, 2006; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

## Glutación



**Esquema 3.** Estructura química del glutatión

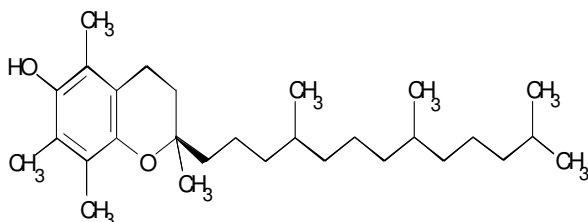
El GSH es un tripéptido (glu-cys-gly). Se sintetiza continuamente en la célula y se degrada fuera de ella. Es el tiol celular más abundante; se mantiene a una concentración del orden de mM. Algunas de las funciones del GSH son:

- 1) Participar en la formación y ruptura de los puentes disulfuro, 2) contribuir a desechar el  $H_2O_2$  ya que es cofactor de la GPx y 3) actuar como cofactor de algunas enzimas

(Mullineaux y Creissen, 1997). El GSH se mantiene en forma reducida principalmente a través de la GR (Nealet *et al.*, 1988).

En condiciones de estrés oxidante se forma gran cantidad de GSSG que se secreta y se degrada (Toledo, *et al.*, 1991). El GSH es capaz de reaccionar con los radicales libres, así como con el  $^1O_2$ , el  $^{\bullet}OH$  y el  $ONOO^-$ .

## Vitamina E

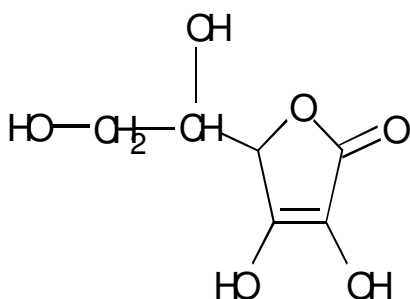


**Esquema 4.** Estructura química de la vitamina E.

También conocido como tocoferol, es un compuesto esencial que se obtiene de los aceites vegetales. Existen 8 isómeros, siendo el más activo el RRR- $\alpha$ -tocoferol (Brigelius-Flohé y Traber, 1999).

Las células incorporan el tocoferol a las membranas plasmáticas. Reacciona con los radicales lipoperoxilo y tocoferilo, limitando de esta manera la propagación de la lipoperoxidación. Al igual que el ascorbato, puede reducir el Fe (III) y el Cu (II) por lo que puede ser prooxidante en presencia de estos metales.

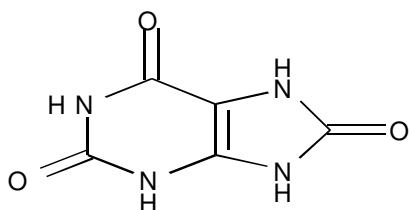
## Vitamina C



**Esquema 5.** Estructura química de la Vitamina C.

El ascorbato o vitamina C se encuentra principalmente en frutas y vegetales, y es soluble en agua. Tiene 2 hidroxilos ionizables que hacen de él un excelente agente reductor. Es capaz de reducir el Fe(III), incluso cuando se encuentra unido a proteínas. También reduce aunque a una menor velocidad, el  $O_2^{\bullet-}$ . Participa en la eliminación del  $H_2O_2$  por medio de la ascorbatoperoxidasa, reacciona con el  $^1O_2$ , el ácido hipocloroso, el  $ONOO^-$ , los radicales peroxilo y el radical tocoferilo. El radical ascorbilo (monodeshidroascorbato) que se forma es estable y se puede desprotonar espontáneamente generando el ascorbato y el dideshidroascorbato. El ascorbato es un excelente reductor, siempre y cuando no esté en presencia de Fe o Cu, pues en esas condiciones se genera el  $\bullet OH$  (Hansberg, 2002).

## Ácido úrico



**Esquema 6.** Estructura química del ácido úrico.

El ácido úrico reacciona con ERO generando el radical de urato, el cual es estable por resonancia electrónica y se puede reducir con el ascorbato. Las melaninas son productos de la polimerización de la dihidroxifenilalanina, producida por las oxidasas de fenoles, como la tirosinasa, o del dihidroxinaftaleno generado por la sintasa de policétidos. Las melaninas son polímeros heterogéneos, insolubles de elevado peso molecular. Tienen una gran cantidad de electrones desapareados, lo que les permite absorber la luz UV y la visible en todas las longitudes de onda. Reaccionan con cualquier especie radical funcionando como oxidantes o reductores.

### 1.4.3. El ajo y sus características



**Esquema 7.** *Alliumsativum* L

El ajo (*Alliumsativum*) es una especie que pertenece a la familia *Liliaceae* comprende alrededor de 600 especies, y es originaria de Asia central (**López, 2007**).

Se ha utilizado desde la antigüedad tanto por sus aplicaciones culinarias como por sus múltiples propiedades medicinales. En los

últimos 30 años se han realizado numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre la química y las propiedades farmacológicas del ajo. De esta manera, actualmente están documentadas muchas de sus propiedades, entre las que destacan: antimicrobiana, antimicótica, anticancerígena, antihipertensiva, inmunosupresora, hipoglucémica y antioxidante, entre otras (**Sato y Miyata, 2000**). Dichas propiedades, se atribuyen a los compuestos sulfurados que están presentes en el ajo, los cuales varían dependiendo de la presentación que se trate (**Lawson, 1998**).

Diversos estudios fitoquímicos han demostrado que los dientes de ajo intactos contienen una alta cantidad de  $\gamma$ -glutamilcisteínas que son hidrolizadas y oxidadas para formar la alina, compuesto mayoritario en los dientes de ajo, al momento de cortarlo o tritararlo, la alinasa (una enzima vacuolar) transforma la alina en alicina, compuesto inestable que se descompone rápidamente en dialilsulfuro (DAS), dialildisulfuro (DADS), dialiltrisulfuro (DATS), vinilditiínas y ajoene (**Amagase et al., 2001**). También contiene compuestos no sulfurados como: enzimas, proteínas, aminoácidos, lípidos, esteroides, glucósidos esteroidales, vitaminas y trazas de elementos y minerales (tiene un alto contenido de selenio) (**Lawson, 1998**).

Desafortunadamente, el ajo intacto no puede ser utilizado como propuesta medicinal debido a la limitada estabilidad de sus compuestos y a su fuerte olor; por tal motivo existen diferentes preparaciones comerciales de ajo como: el

EAE, el extracto acuoso de ajo, el aceite de ajo, el polvo de ajo, el jugo de ajo fresco, entre otros; cada una de estas tiene diferente composición de compuestos sulfurados y esto depende tanto de los procesos de obtención como de la presentación que se trate, como se muestra a continuación.

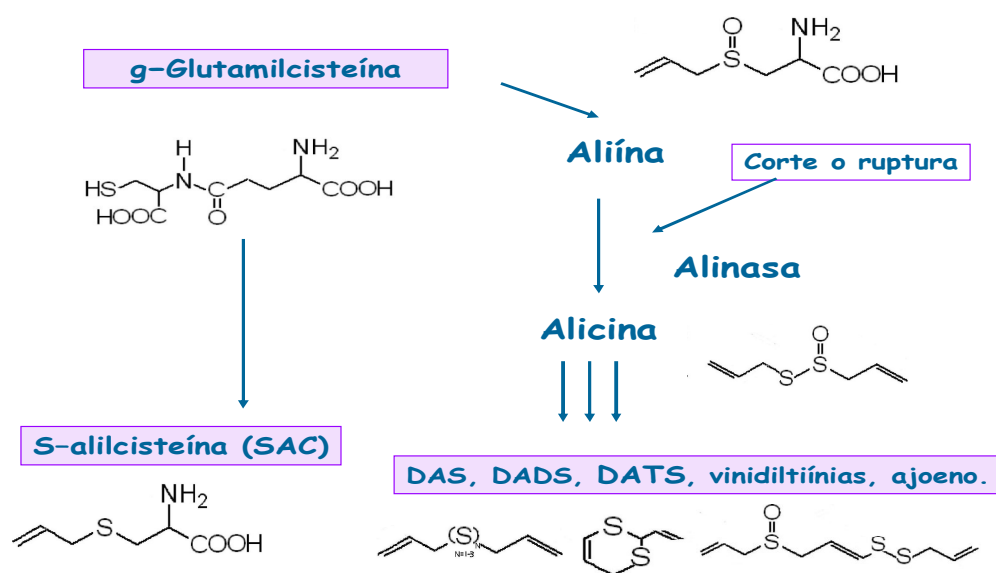
**Tabla 1.** Principales compuestos sulfurados presentes en los dientes de ajo, extracto de ajo envejecido, polvo y aceite de ajo.

Diente de ajo	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	(mg/g producto)
g-glutamilcisteínas	6.0–14.0
Compuestos derivados de la alina	5.0–15.0
	3.5–8.0
Extracto de ajo envejecido	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	0.2–0.4
g-glutamilcisteínas	0.2–0.5
g-glutamil-S-alilcisteína	0.1–0.4
S-alilcisteína	0.5–0.7
S-alilmercaptocisteína	0.1–0.2
Compuestos derivados de la alina	0.1–0.2
Polvo de ajo	
S-alilcisteína sulfóxido (alina)	10.0–17.0
g-glutamilcisteínas	12.0–35.0
Compuestos derivados de la alina	4.0–11.0
Aceite de ajo	
<b><u>Destilación con vapor:</u></b>	
Dialildisulfuro	0.05–2.8
Dialitrisulfuro	0.04–2.0
Alilmetiltrisulfuro	0.03–1.7
Compuestos derivados de la alina	0.2–11
<b><u>Macerado:</u></b>	
Vinilditiínas	0.1–4.7
Ajoene	0.02–1.1
Dialitrisulfuro	0.02–0.45
Compuestos derivados de la alina	0.4–6.0

### 1.4.3.1. Extracto de ajo envejecido

Existen diferentes preparaciones de ajo, pero el EAE posee ciertas ventajas de uso con respecto a otras debido a que: 1) no posee el olor característico de otras presentaciones (Yoshida *et al.*, 1984), 2) no presenta efectos tóxicos (Lawson, 1998; Yoshida *et al.*, 1984), 3) tiene un alto contenido de antioxidantes (Munday *et al.*, 1999), 4) en diferentes publicaciones científicas se ha demostrado su posible uso terapéutico en humanos (Takasu *et al.*, 2002; Durak *et al.*, 2004).

El extracto de ajo envejecido se elabora a partir del ajo crudo (*Allium sativum*) rebanado, macerado con etanol acuoso al 15-20% por más de 20 meses a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo el extracto es filtrado y concentrado a presión reducida a baja temperatura. Sus componentes más abundantes son: la alina, la  $\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína, la  $\gamma$ -glutamil-L-cisteína, S-alilcisteína (SAC) y la S-alilmercaptocisteína (SAMC), aunque también contiene compuestos insolubles. (Lawson, 1998).



**Esquema 8.** Cambios químicos de los compuestos presentes en el ajo (Amagase *et al.*, 2001).

#### 1.4.3.1.1. Evidencia de propiedades antioxidantes del ajo.

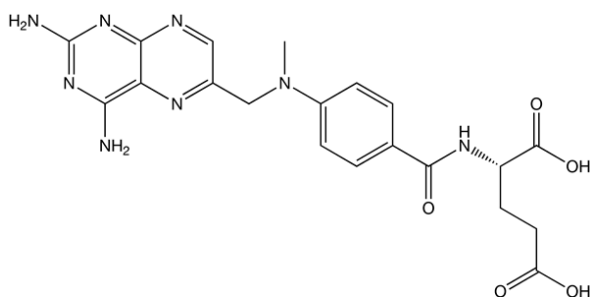
Algunos estudios han encontrado que el extracto de ajo envejecido posee propiedades antioxidantes *in vitro* (Maldonado *et al.*, 2009).

Se ha informado de su capacidad para inhibir la lipoperoxidación en células del endotelio vascular provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas (Dillon *et al.*, 2003), también hay evidencia de que los extractos acuosos de ajo, polvo de ajo y ajo encurtido son eficaces atrapando ONOO<sup>-</sup> (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2007).

En el caso del extracto acuoso del diente de ajo, se ha descrito su capacidad para atrapar OH<sup>•</sup> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la formación de HO<sub>2</sub><sup>•</sup> lipídicos; asimismo, se ha demostrado que el extracto acuoso de polvo de ajo también es capaz de inhibir la oxidación de lipoproteínas y de atrapar OH<sup>•</sup> y O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2006).

#### 1.4.4. METOTREXATO

##### 1.4.4.1. Descripción



El metotrexato también llamado ametofterina es un antimetabolito de la familia de los folatos, es un análogo de la aminopterin, producto que también deriva del ácido fólico.

**Esquema 8.** Estructura química del metotrexato

El MT fue utilizado inicialmente en 1948 en el tratamiento de la leucemia linfocítica de la infancia, desde entonces ha sido empleado contra numerosas enfermedades malignas, incluyendo osteosarcomas, linfoma de no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin,

linfoma cutáneo de células T (micosis fungoides) y cánceres de cabeza y de cuello. El MT también posee efectos inmunosupresores y es utilizado en el tratamiento de la artritis reumatoide, así como en la prevención de otras enfermedades autoinmunes como la psoriasis.

#### 1.4.4.2. **Mecanismo de acción**

El MT inhibe competitivamente la dihidrofolato-reductasa, enzima responsable de convertir el ácido fólico a tetrahidrofolato, el cofactor necesario para la transferencia de un carbono en muchas reacciones metabólicas. Algunas de estas reacciones afectan la proliferación celular, incluyendo la síntesis de ácido timidílico y de los precursores nucleótidos del DNA y RNA.

La inhibición de la timidilato-sintasa es, quizás, el efecto más importante del metotrexato resultando en una inhibición de la síntesis del DNA, por lo que los efectos inhibidores del metotrexato dependen de sus concentraciones intracelulares, y los tejidos con mayor metabolismo celular y crecimiento más rápido son los más afectados. Entre estos, se encuentran los tejidos neoplásicos, los folículos capilares, las células epiteliales del tracto digestivo y las células de la médula ósea.

El metotrexatoinhibe la proliferación celular en la fase S del ciclo celular, en dosis altas ( $> 30 \text{ mg/m}^2$ ) y realiza la entrada desde G1 a S. Adicionalmente el MT puede inhibir la síntesis de proteínas debido a la reducción que experimentan los cofactores del folato, siendo este posiblemente el mecanismo por el cual las dosis altas de metotrexato paran las células en la fase G1 (**GoodmanyGilman, 2007**).

Un factor crítico sobre los efectos citotóxicos del MT es la duración de la exposición al mismo, por lo que una exposición prolongada, incluso a dosis bajas, puede producir una citotoxicidad y toxicidad significativas, ya que éste penetra en las células utilizando 2 mecanismos de transporte: el primero utiliza un transportador de folato reducido que muestra una alta afinidad hacia el



metotrexato y también para los folatos reducidos, mientras que el segundo consiste en una difusión pasiva, este último mecanismo no reviste gran importancia a menos que el MT se administre en dosis muy altas (concentraciones séricas  $>100$  mM); una vez en el interior de la célula, experimenta la polimerización de la cadena lateral de ácido glutámico para formar el poliglutamato de metotrexato.

Tanto el MT como su derivado poliglutámico inhiben la dihidrofolato-reductasa. Sin embargo, el derivado poliglutámico, al ser de mayor tamaño resiste mejor que el MT el transporte hacia afuera, mecanismo por el cual las células se libran de productos tóxicos. La formación del derivado poliglutámico se lleva a cabo con mayor facilidad en las células tumorales que en las células de mamífero lo que explica la relativa selectividad del fármaco hacia las células tumorales; la formación del poliglutamato de metotrexato (PG-MTX) depende tanto de la concentración intracelular del fármaco como de la duración de la exposición. La resistencia al metotrexato se desarrolla a través de una serie de mecanismos como son:

- disminución de la entrada del fármaco en la célula
- reducción de la unión del metotrexato a la dihidrofolato-reductasa
- aumento de la concentración o actividad de la dihidrofolato-reductasa
- disminución de la formación del PG-MTX, lo que supone desarrollo de resistencias incluso a grandes dosis del fármaco

Los dos primeros mecanismos son usualmente involucrados en el desarrollo de resistencia al metotrexato, la disminución de la formación del PG-MTX sólo tiene lugar cuando las exposiciones son cortas ( $< 24$  horas).

#### 1.4.4.3. **Farmacocinética**

El MT se administra por vía oral, intravenosa, intramuscular o intratecal; cuando se administra por vía oral, el metotrexato se absorbe en el tracto digestivo mediante un mecanismo de transporte activo, puede saturarse si las dosis del fármaco son muy elevadas, las dosis orales de  $30$  mg/m<sup>2</sup> muestran una biodisponibilidad del 60%, reduciéndose ésta si las dosis son de  $> 50$  mg/m<sup>2</sup>;

en estos casos, se aconseja dividir las dosis para evitar los procesos de saturación (**Goodmany Gilman, 2007**).

En los pacientes con leucemia, la absorción del metotrexato es muy variable; después de una dosis de  $20 \text{ mg/m}^2$ , se han visto diferencias de hasta 20 veces entre las concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{\text{max}}$  entre  $0.11\text{-}2.3 \mu\text{M}$ ). Por otra parte, el metotrexato oral experimenta un metabolismo de primer paso en el hígado lo que limita su biodisponibilidad; los alimentos retrasan la absorción y reducen las  $C_{\text{max}}$ ; por vía intramuscular, es bien absorbido alcanzando las concentraciones plasmáticas máximas en un plazo de 30 a 60 minutos. Después de la inyección intratecal pasa lentamente a la circulación general, el volumen de distribución es similar al volumen total de agua.

El MT se une a las proteínas del plasma en un 50-60%, sobre todo a la albúmina, por ser un ácido débil es desplazado de su unión a las proteínas por otros ácidos débiles tales como el ácido acetil-salicílico, las tetraciclinas, el cloramfenicol o las sulfonamidas; difunde lentamente en los fluidos del tercer compartimento (efusiones pleurales, ascitis, etc), debiéndose evacuar estas efusiones antes de la siguiente dosis; experimenta un metabolismo intracelular al poliglutamil-metotrexato (PG-MTX), pudiendo ser convertido de nuevo a metotrexato por las hidrolasas celulares. El PG-MTX puede quedar retenido en algunos tejidos durante períodos de tiempo considerables, dependiendo de la naturaleza de los tejidos y de los tumores. Una pequeña parte del MT es metabolizado a 7-hidroximetotrexato, metabolito que supone entre el 7 y 33% de la excreción del fármaco en la fase terminal de eliminación. Adicionalmente, parte del metotrexato es metabolizado por la flora intestinal después de su administración oral. Cuando se administra en dosis bajas por vía intravenosa ( $30 \text{ mg/m}^2$ ) aproximadamente el 10% se elimina en forma de metabolitos, mientras que la misma dosis se administra por vía oral, los metabolitos ascienden al 35% de la dosis (**Goodmany Gilman, 2007**).

Los factores que reducen la absorción de los alimentos son los antibióticos orales no absorbibles (por ejemplo, la vancomicina, neomicina y bacitracina), y más rápido el tránsito por el tracto gastrointestinal (GI) de las vías tales como la

diarrea, mientras que el tiempo de tránsito más lento en el tracto gastrointestinal de estreñimiento aumentará la absorción.

Se conjuga parcialmente con la enteroalbúmina después de su absorción y puede aumentar su toxicidad debido al desplazamiento de ciertos fármacos como los salicilatos, sulfonamidas, difenilhidrantoína, fenilbutazona, y por algunos antibióticos como terramicina y cloranfenicol. El empleo de dosis altas de MT aumenta el potencial de toxicidad del fármaco, dicha toxicidad puede disminuirse con el uso combinado del ácido polínico (**GoodmanyGilman, 2007**), su eliminación ocurre en tres fases: la primera fase, con un tiempo de vida media de 45 minutos es la fase de distribución.

Sigue la fase de eliminación de unas 3.5 h consistente en la eliminación renal y, finalmente una fase terminal con un tiempo de vida media de 10-12 horas. Si se prolonga indebidamente esta fase terminal de desaparición debido a insuficiencia renal, puede causar los principales efectos adversos del medicamento en médula ósea, epitelio gastrointestinal y piel. Esta fase refleja la distribución enterohepática del fármaco y es la que determina la toxicidad hematológica y gastrointestinal del fármaco.

La distribución del MT en espacios corporales, como cavidad pleural o peritoneal, es lenta. Sin embargo si se expanden estos últimos, pueden actuar como un sitio de almacenamiento y liberación lenta del fármaco, con el aumento prolongado resultante de las concentraciones en plasma y efectos adversos graves (**Goodman y Gilman, 2007**).

Cuando se administra en dosis elevadas, pueden producirse concentraciones elevadas del fármaco en orina, concentraciones que pueden exceder los límites de solubilidad del metotrexato y el 7-hidroxi metotrexato, en particular cuando el pH es inferior a 7. En estos casos se recomienda la intensa hidratación del paciente y la alcalinización de la orina. Ni la hemodiálisis ni la diálisis peritoneal de rutina afectan la depuración del metotrexato. Sin embargo, se han comunicado casos en que se consiguió la eliminación del fármaco mediante

hemodiálisis intermitente en un dializador de alto flujo (GoodmanyGilman,2007).

La mayor parte de la dosis administrada es eliminada en la orina de 12 horas mediante un mecanismo de secreción tubular y, por tanto, algunos ácidos débiles como las penicilinas pueden retardar su eliminación. La excreción biliar supone aproximadamente el 10% de la dosis.

#### **1.4.4.4. Efectos secundarios**

Como todos los medicamentos el MT puede también tener efectos secundarios; los más comunes son dolor de estómago, náuseas, vómitos, pérdida del apetito, diarrea y úlceras bucales. Si estos problemas aparecen se debe contactar al médico inmediatamente, un cambio en la dosis o como tomar el medicamento puede reducir el problema. Ocasionalmente pueden haber dolores de cabeza, mareos, alteraciones de la manera como uno se siente, salpullidos o incluso pérdida de peso.

También se ha observado aumento de la sensibilidad al sol, aunque es poco frecuente, pueden aparecer alteraciones en los exámenes de laboratorio. Especialmente puede haber una disminución de los glóbulos blancos, lo que en algunos casos puede facilitar las infecciones, una disminución de las plaquetas puede aumentar la tendencia al sangrado o a los hematomas. También puede haber una disminución de los glóbulos rojos lo que puede causar fatiga y a veces dolor de cabeza. Algunos de estos efectos secundarios son más frecuentes en las personas que han tenido problemas a los riñones, un nivel bajo de ácido fólico y también con el uso de ciertos medicamentos como las sulfas. Raramente pueden existir problemas a los pulmones, produciéndose una neumonitis.

## **2. Justificación**

El MT es un fármaco capaz de causar daño renal, a pesar de que las dosis están ajustadas para evitarlo: sin embargo, la combinación con algunos fármacos, el uso prolongado, uso de dosis altas y estado inicial del paciente son causantes de que se presente o se complique una nefrotoxicidad.

La nefrotoxicidad que ocasiona el MT complica el estado del paciente debido a que aumenta la acumulación de fármacos además de productos finales del metabolismo.

El ajo es un vegetal del cual existen diferentes preparados. El EAE contiene diversos compuestos con actividades biológicas benéficas, entre las cuales se encuentran las siguientes: anti-hipertensivo, antimicrobiano, hipoglucémico, inmunosupresor, anticancerígeno y antioxidante.

Por lo antes descrito en este trabajo de tesis se planteó utilizar el EAE para investigar la capacidad que pueda tener para proteger contra el daño renal que genera el MT, esto contribuirá con la búsqueda de soluciones para disminuir o evitar el daño renal ocasionado por anticancerígenos.

### **3. Objetivo general**

- Evaluar la nefrotoxicidad ocasionada por la administración de metotrexato en ratas y el posible efecto protector del extracto de ajo envejecido.

#### **3.1. Objetivos particulares**

- Determinar la dosis adecuada para establecer la insuficiencia renal aguda por metotrexato en ratas.
- Determinar si el extracto de ajo envejecido, tiene efecto benéfico en la nefrotoxicidad ocasionada por metotrexato.
- Evaluar el estrés oxidante en el modelo de metotrexato y en la protección generada por el ajo.

## **4. Material y Métodos**

### **4.1. Animales**

Se utilizaron ratas macho Wistar de 290-310 g de peso, las cuales permanecieron durante el tratamiento en cajas metabólicas (NALGE COMPANY), con alimentación (RODENT LABORATORY CHOW) y agua *ad libitum*. Se mantuvieron bajo condiciones de luz artificial con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, así como condiciones estándar de temperatura a  $24 \pm 1^\circ \text{C}$ , durante todo el procedimiento se cuidó la integridad del sujeto en estudio.

### **4.2. Reactivos**

En cuanto a las determinaciones de creatinina en suero, depuración de creatinina y nitrógeno de urea en suero se llevaron a cabo mediante la utilización de estuches comerciales SPINREACT de LAB CENTER DE MÉXICO. El ácido tiobarbitúrico, tetrametoxipropano, mesilato de deferoxamina, nitroazul de tetrazolio, NADPH, hidroxitoluenobutilado (BHT), glutatión reductasa, glutatión reducido, albúmina sérica bovina, el reactivo de Folin, carbonato sódico, p-nitrofenol-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido, xantina y xantina oxidasa de SIGMA CHEMICAL. 5-tio-2-nitrobenzoico DTNB; etanol, fosfato de potasio monobásico, fosfato de sodio dibásico, butanol, piridina, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, tartrato sódico potásico, peróxido de hidrógeno, sulfato de amonio y sal disódica del ácido etileno diaminotetracético de JT BAKER. El sulfato cúprico y carbonato de sodio de MALLINCKRODT. El cloruro de cobre fue de RIEDEL-DE HAËN.

### **4.3. Antioxidante (EAE)**

El extracto de ajo envejecido que se utilizó para éste experimento es de marca comercial Kyolic®, el cual se cultiva de forma orgánica, libre de pesticidas, herbicidas y fertilizantes químicos.

Una vez recolectado, se envejece de forma natural durante 20 meses, durante este tiempo los compuestos olorosos e irritantes que contiene el ajo se transforman en compuestos de azufre hidrosolubles, entre ellos, destaca la S-allilcisteína y la S-mercaptocisteína, que solo se forman después del proceso

de envejecimiento, por otro lado, más de 100 estudios científicos han confirmado que es el único extracto con todos los constituyentes, siendo validado por su utilidad y seguridad.

Kyolic® dispone del GMP de buenas prácticas, el ISO 9002 y posee 12 patentes internacionales.

#### **4.4. Fármaco (MT)**

Se utilizó un liofilizado de 500 mg para reconstituir una solución inyectable (Medsatrexate®, de ASOFARMA DE MEXICO, S.A. DE C.V).

#### **4.5. Muestras**

##### **Orina**

Se recolectó orina de cada 24 h. La orina se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una centrífuga EBA 20. Se tomaron 2 alícuotas de 1 mL cada una en micro tubos y se mantuvieron en congelación para su uso posterior.

##### **Suero**

El suero se obtuvo de la sangre que se recolectó al momento de sacrificar las ratas. La sangre de cada rata se recolectó en diferentes tubos de vidrio, transcurridos 10 min se separó el coágulo y las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, del suero obtenido se transfirió una alícuota en micro tubos y se mantuvieron en congelación para su uso posterior.

##### **Riñón**

Se obtuvieron los riñones de cada una de las ratas, se cortaron transversalmente y se colocaron en papel aluminio para guardarlos a -20°C para su uso posterior.



### **Homogenados para TBARS**

Para la preparación del homogenado de riñón completo se hizo una dilución de tejido 1:10 (p/v) en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 con BHT 0.1 M, empleando un homogenador tipo politrón PT 10-35 durante 20 segundos, enseguida se sonicaron durante 10 segundos con unsonicador SONICS-vibra cells; las muestras obtenidas se colocaron en micro tubos y se mantuvieron en refrigeración, para su uso posterior.

### **Homogenados con inhibidores de proteasas**

Para la preparación del homogenado de riñón completo se hizo una dilución de tejido 1:4, en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 con tritón 1%, empleando un homogenador tipo politrón durante 20 segundos, posteriormente se centrifugaron en una microcentrifuga Beckman a 15,300 rpm durante 1 hora a 4°C. Los sobrenadantes se colocaron en micro tubos y se mantuvieron en congelación para su uso posterior.

### **Cuantificación de proteínas**

Esta determinación se realizó de acuerdo al método colorimétrico de Lowry y colaboradores (1951).

## **4.6. Diseño experimental**

### **4.6.1. Establecimiento de la dosis de metotrexato para ocasionar daño renal**

Se pesaron y marcaron 9 ratas, posteriormente se dividieron en 3 grupos: 1) control; 2) metotrexato a una dosis de 100 mg/kg y 3) metotrexato a una dosis de 125 mg/kg; el metotrexato se administró por vía intraperitoneal (i.p.), este protocolo tuvo una duración de 48 h durante las cuales las ratas diariamente se pesaron, se administraron (día 0) y se colocaron en cajas metabólicas para obtener orina de 24 h (del día 1 al día 2), se sacrificaron por decapitación el día 2, se recolectó la sangre y se obtuvieron los riñones.

#### **4.6.2. Evaluación del efecto del EAE**

Se utilizó la dosis de 100 mg/kg para determinar si el EAE es capaz de evitar o disminuir el daño renal.

Las ratas se pesaron, marcaron y dividieron en 4 grupos: 1) control (CT); 2) metotrexato de 100 mg/kg (MT); 3) extracto de ajo envejecido de 1.2 mL/Kg (EAE) y 4) extracto de ajo envejecido y metotrexato (MT + EAE). El metotrexato y el extracto de ajo envejecido se administraron por vía intraperitoneal (i.p.), mientras que el extracto de ajo se administró 2 veces, cada 24 h, 30 min antes que el MT.

El protocolo tuvo una duración de 48 h, el día 0 se administraron, el día 1 se metieron a las cajas metabólicas y se recolectaron muestras de orina para ser sacrificadas por decapitación el día 2; se recolectó la sangre y los riñones, para evaluar el daño renal, marcadores de estrés oxidante y la actividad de enzimas antioxidantes en riñón.

#### **4.7. Evaluación de la IRA**

##### **4.7.1. Función tubular**

##### **Cuantificación de proteínas en orina**

Esta determinación se realizó mediante el método turbidimétrico con ácido tricloroacético (TCA) a 420 nm (**Pedraza-Chaverriet *al.*, 1999**). Se utilizó 1 mL de orina diluida 1:5 con solución salina para obtener un volumen final de 2 mL, se separaron las muestras en dos alícuotas de 1 mL, a una de ellas se le adicionaron 250 µL de TCA al 12.5% y se leyó 420 nm, se preparó un blanco para cada muestra, donde a la segunda alícuota se le adicionaron 250 µL de solución salina; se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las absorbencias se intrapolaron en una curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB) al 0.1% entre 0,04 y 0.8 mg/mL. Los datos se expresaron en mg de proteína/24 h.

#### 4.7.2. Función glomerular

##### **Creatinina en suero**

La creatinina es producto del metabolismo de la fosfocreatina, el cual es un reservorio de energía en el músculo que se forma por la acción de la creatinfosfocinasa (CPK) a partir de la creatina. La creatinina pasa del músculo a la circulación a una velocidad constante.

El glomérulo renal filtra la creatinina y los túbulos no la reabsorben, por lo cual el índice de excreción en la orina es también constante (**Tresseler, 1998**). En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Los niveles altos de creatinina en sangre indican insuficiencia renal.

La creatinina presente en suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé, basado en la generación de un complejo anaranjado al reaccionar la creatinina con el ácido pícrico en solución alcalina. El producto formado absorbe a 492 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra.

En una celda se adicionaron 50  $\mu$ L del suero desproteinizado y 500  $\mu$ L de la mezcla de reacción (ácido pícrico 17.5 mM e hidróxido de sodio 0.29 M, 1:1), se leyó en el espectro a los 0, 30, 60 y 90 s; antes de leer las muestras se ajustó la lectura a cero con un blanco con agua, posteriormente se leyó el estándar de creatinina de 2 mg/dL a los tiempos antes mencionados. La cantidad de creatinina presente en las muestras se obtuvo calculando el cociente de las diferencias de densidad óptica de las lecturas de 90 y 30 s, entre las del estándar por la concentración del mismo. Los resultados se expresan como mg de creatinina/dL.

##### **Depuración de creatinina**

La creatinina es excretada sin cambio en la orina debido a que se modifica poco durante su paso a través de la nefrona. Los riñones la excretan con mayor facilidad que la urea o el ácido úrico (**Tresseler, 1998**), la depuración de la

creatinina se emplea como un marcador para evaluar la función renal, ya que es una manera de medir la velocidad de filtración glomerular (**Pedraza-Chaverrié *et al.*, 1999**).

Para ello fue necesario cuantificar la concentración tanto en orina como en suero. Se calculó la depuración de la creatinina usando la siguiente fórmula:

$$DC \text{ (mL/min)} = \frac{\text{Creatinina en orina (mg/dL)} * \text{Volumen urinario de 24 h (mL)}}{\text{Creatinina en suero (mg/dL)} * 1440 \text{ (min)}}$$

1440 son los minutos que hay en 24 horas.

### **Nitrógeno de la urea en el suero sanguíneo (BUN)**

La urea es el producto terminal del catabolismo de los grupos amino de los aminoácidos. La urea se sintetiza en el hígado a partir del amoníaco generado a partir de los aminoácidos de las proteínas. Debido a que el organismo no utiliza urea, se transporta en la sangre hasta que se excreta por vía urinaria. Sus concentraciones varían fisiológicamente, dependiendo de manera directa del consumo de proteínas en la dieta y del estado de hidratación.

La urea es excretada en el filtrado glomerular y se reabsorbe en el túbulo de la nefrona de manera deficiente. Por lo que sólo se excreta una fracción de todo el material contenido en el filtrado glomerular.

Para realizar esta determinación se utilizó un estuche comercial, es un método colorimétrico adaptado en la reacción descrita por Jung y colaboradores (1975). Consiste en la reacción de la urea con el ortoftalaldehído a 37°C en medio ácido desarrollando un producto colorido que muestra un máximo de absorbencia a 510 nm.

## 4.8. Evaluación del estrés oxidante

### 4.8.1. Marcadores de estrés oxidante

#### **Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Para determinar el índice de lipoperoxidación se cuantificaron los niveles de malondialdehído (MDA) midiendo las sustancias que reaccionan con el método del ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual se basa en que algunos productos formados a consecuencia de la interacción de los radicales libres con moléculas celulares que pueden reaccionar con el 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 colocó en tubos de vidrio un equivalente a 0.5 mg de proteína correspondientes a cada muestra, se llevó el volumen a 100  $\mu$ L con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, se agregaron 500  $\mu$ L de solución TBA 0.026 M /HCl0.211 M /TCA 6.66% / DFO 1 mM a cada uno de los tubos incluidos el blanco y los estándares, se agitaron en vórtex y se colocaron todos los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y en seguida se añadieron 0.5 mL de butanol/piridina (15:1 v/v) a cada uno de los tubos únicamente con muestra, para así extraer la capa de lípidos, se agitaron una vez más en vórtex y se centrifugaron a 3,000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener la fase superior de cada tubo; las muestras se leyeron a 532 nm.

Los resultados se obtuvieron interpolando la absorbencia de las muestras problema en una curva patrón utilizando MDA. La lipoperoxidación se expresó en nmoles de MDA/mg de proteína.

#### **Determinación de tioles**

Existen algunas plantas que concentran particularmente compuestos tiólicos, principalmente cisteína, es reconocida la capacidad de los grupos tioles de atrapar radicales libres en forma similar a lo que ocurre con los compuestos fenólicos (Horieet *al.*, 1992).

Para la determinación de los tioles solubles en los tejidos se realizó una dilución 1:5 del homogenado en PBS pH 8.0, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida, colocándose en una celda y adicionando 80  $\mu\text{L}$  de una solución 1 mM de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (DTNB) en PBS pH 8.0 y se midió de inmediato su absorbencia a 412 nm.

El espectrofotómetro se ajustó previamente a cero con PBS pH 8.0 y se realizó un blanco con PBS pH 8.0 y solución de DTNB. La concentración de tioles se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar a 412 nm ( $\epsilon_m = 13.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **4.8.2. Actividad de enzimas antioxidantes en el riñón**

##### **Actividad de la superóxidodismutasa total (SOD)**

Esta determinación se realizó mediante la reacción de reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) (**Oberley y Spitz, 1984**); por lo que 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  $\mu\text{M}$ , ASB 0.006% y carbonato de sodio 49 mM, posteriormente se colocaron 2.45 mL de la mezcla de reacción en dos tubos de ensayo que se mantuvieron a 27°C. Después se agregaron 0.5 mL del homogenado renal diluido 1:100 con agua destilada, la reacción se inició inmediatamente agregando 50  $\mu\text{L}$  de la solución de xantina oxidasa. Se preparó 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, y transcurrido el tiempo indicado de incubación se agregó 1 mL de cloruro cúprico 0.8 mM y se leyó la densidad óptica a 560 nm; los datos se expresaron como U de SOD/mg de proteína, donde una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción de NBT.

### **Actividad de catalasa (CAT)**

La medición de la actividad de la CAT se realizó utilizando el método de Aebi (1982). En una celda de cuarzo se adicionaron 25  $\mu$ L del homogenado diluido 1:100 en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.0, se mezcló con 725  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 7.7 mM en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.0, midiendo el cambio de absorbancia a 240 nm a los 0, 15 y 30 segundos, el cual es el lapso en que la descomposición del  $H_2O_2$  sigue una cinética de primer orden (Aebi, 1982). De acuerdo a Aebi (1982), se usó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la catalasa, la cual queda definida de acuerdo a la siguiente formula:  $K = (1/t) (2.3 \cdot \log A_1 / [A_2])$ , donde  $t = t_2 - t_1$ ,  $A_1$  y  $A_2$  son las absorbancias del  $H_2O_2$  en los tiempos  $t_2$  y  $t_1$ .

### **Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)**

Para medir la actividad de esta enzima se empleó el método de Lawrence y Burk (1976). El GSH actúa como cofactor catalizando la reducción del  $H_2O_2$  por la GPx, el GSSG producido es regenerado por la glutatión reductasa con ayuda del NADPH. El ensayo se basa en el consumo de NADPH midiendo la densidad óptica a 340 nm en la reacción de regeneración de GSH, para ello se realizó una dilución del homogenado 1:10 con amortiguador de fosfatos y 100  $\mu$ L de esta dilución se mezclaron con 800  $\mu$ L de la siguiente solución: 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 y glutatión reducido 1 mM.

Se preparó un blanco con la muestra de reacción y agua destilada, las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente; posteriormente adicionó todo el volumen a la celda con 100  $\mu$ L de solución de sustrato y se leyó a 340 nm por 3 min en intervalos de 1 min, ajustando previamente el espectro a cero con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0; los datos se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad se define como la cantidad de muestra que consume 1  $\mu$ mol de NADPH en un minuto.

#### **4.9. Análisis estadístico**

El análisis de los resultados se realizó empleando el programa Prism versión 3.02, (GraphPad, San Diego, CA, E.U) mediante ANOVA y comparaciones múltiples de DUNNET. Utilizando el valor de la media  $\pm$  E.E.M; un valor de  $P < 0.05$  vs CT o MT se consideró estadísticamente significativo.



## **5. Resultados y discusión**

### **Establecimiento de la dosis de metotrexato para ocasionar daño renal**

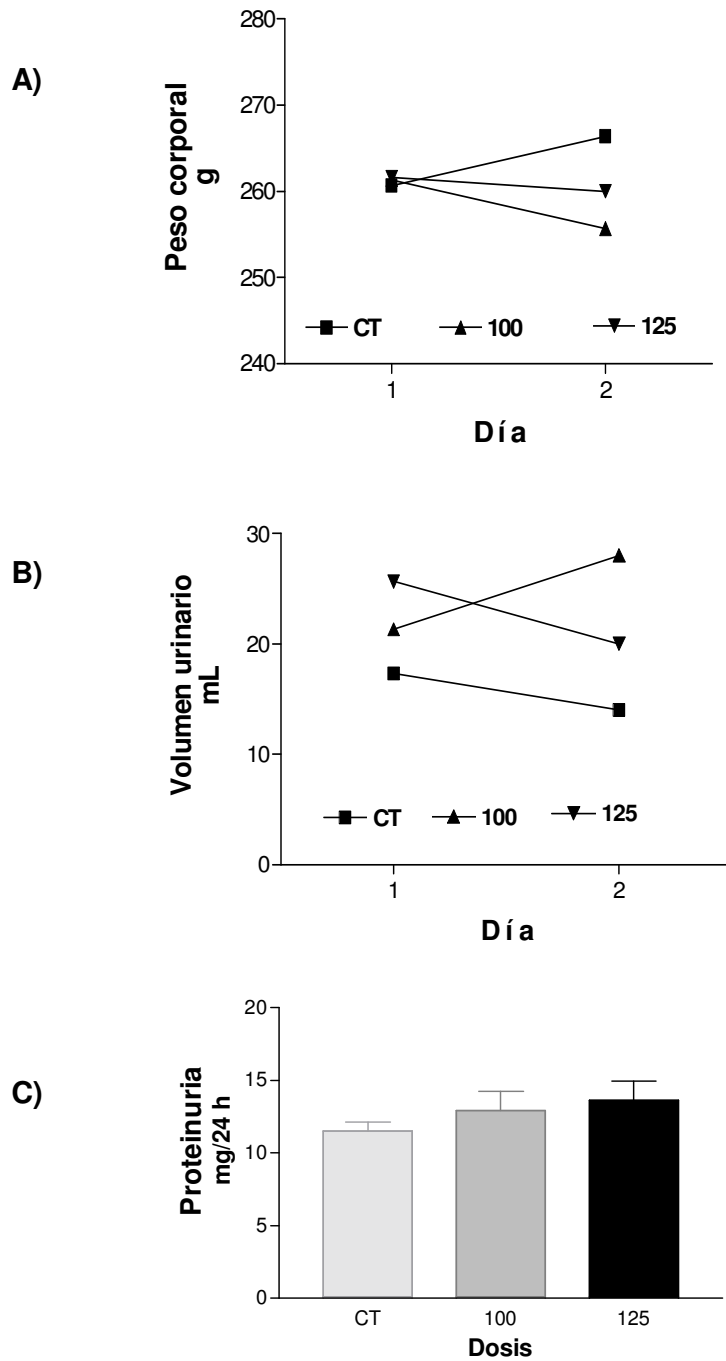
Para la determinación de la dosis para establecer el modelo de daño renal inducido por metotrexato, se administró el MT por vía intraperitoneal (i.p.) a 2 diferentes dosis 100 mg/kg y 125 mg/kg.

Se evaluó el daño renal mediante la medición de creatinina en suero, depuración de creatinina, nitrógeno de urea en suero y proteínas en orina.

Los resultados obtenidos en cuanto al peso corporal de las ratas con MT a las dos diferentes dosis presentaron una tendencia a disminuir, pero no se observó una diferencia significativa con respecto a los CT observado en la (Figura 1A); en lo que respecta al volumen urinario no presentó cambios, ya que no se observó diferencia alguna, tal y como se muestra en la Figura 1B.

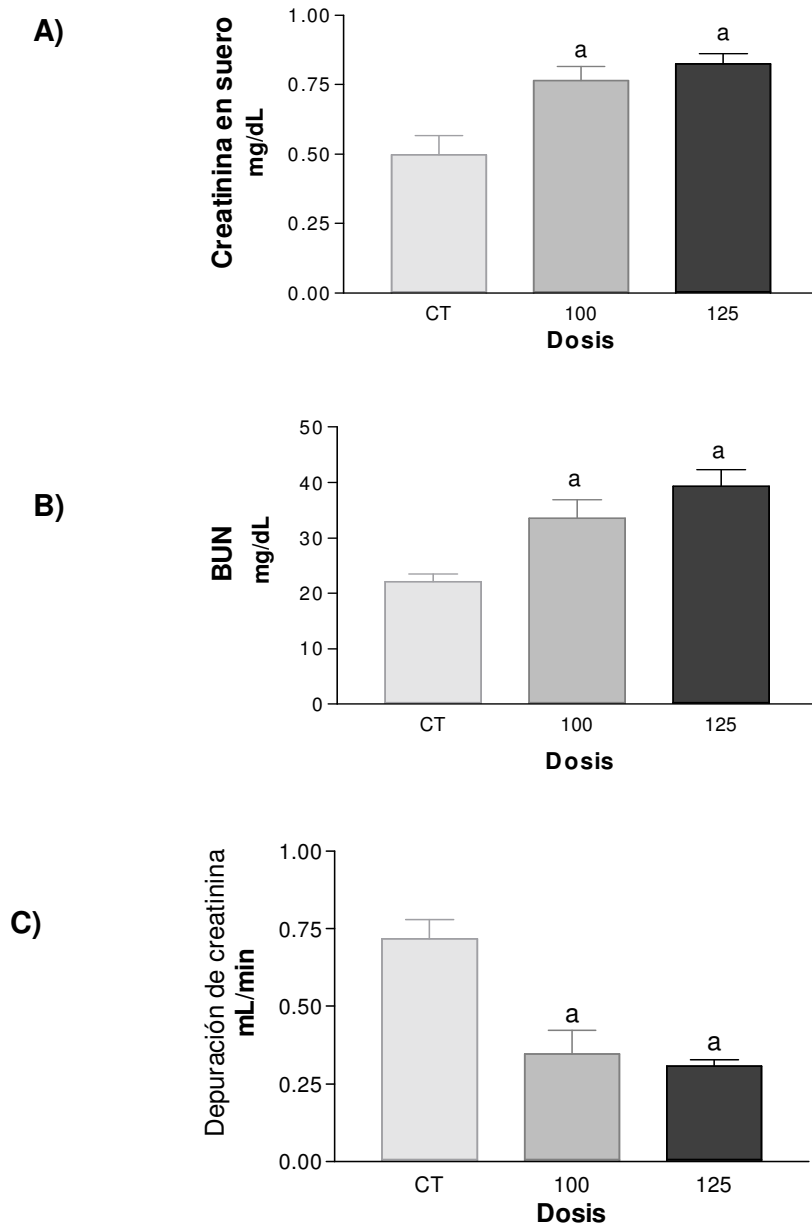
En relación a los marcadores de daño tubular se midió la excreción urinaria de proteínas; obteniendo un aumento no significativo, aunque se esperaba un aumento de los grupos tratados con el anticancerígeno (Figura 1C).

Por lo tanto, los animales no presentaron daño en el túbulo en el tiempo estudiado y solo provocó daño a nivel glomerular.



**Figura 1.** (A) peso corporal y (B) volumen de orina en los días 1 y 2 después de la administración del MT. (C) proteinuria (Día 2) de las ratas administradas a diferentes dosis de MT. Promedio  $\pm$  EEM, n=3-4.

Se evaluó el daño renal a nivel glomerular, mediante la medición de creatinina en suero, depuración de creatinina y nitrógeno de urea en suero, como se observa a continuación.



**Figura 2. Efecto de dos dosis de MT sobre la función renal. (A) Creatinina en suero (B) Nitrógeno de urea en suero (BUN), (C) Depuración de creatinina. Promedio  $\pm$  EEM. n=3. <sup>a</sup>P<0.05 vs CT.**

En el parámetro de creatinina en suero, el grupo control se mantuvo constante y con valores normales con respecto a los grupos con diferentes dosis de MT

que tuvieron valores superiores a los del grupo CT (Figura 2A). El nivel de creatinina fue ligeramente mayor en la dosis de 125 mg/kg de MT.

La depuración de creatinina de las ratas tratadas con MT fue menor que la del grupo CT (Figura 2C), esto como consecuencia de la disminución de los niveles de creatinina.

Se observó que los niveles de BUN en el grupo control fueron normales. En los grupos tratados con el anticancerígeno se aprecia un aumento en ambas dosis, siendo mayor a una dosis de 125 mg/kg de MT (Figura 2B).

En ambas dosis probadas observamos daño renal, en la dosis de 125 mg/Kg el daño fue ligeramente mayor; sin embargo en dicha dosis el 50% de las ratas murieron. En la dosis de 100 mg/kg todos los sujetos sobrevivieron y se observa bien establecido el daño renal; por lo tanto se decidió trabajar con esta dosis.

Considerando los resultados obtenidos en esta primera parte del protocolo se decidió realizar solo la evaluación de daño a nivel glomerular para los experimentos posteriores, los parámetros de creatinina, BUN y depuración de creatinina utilizados como marcadores de disfunción glomerular fueron los que nos ayudaron a determinar que la IRA inducida fue a nivel glomerular.

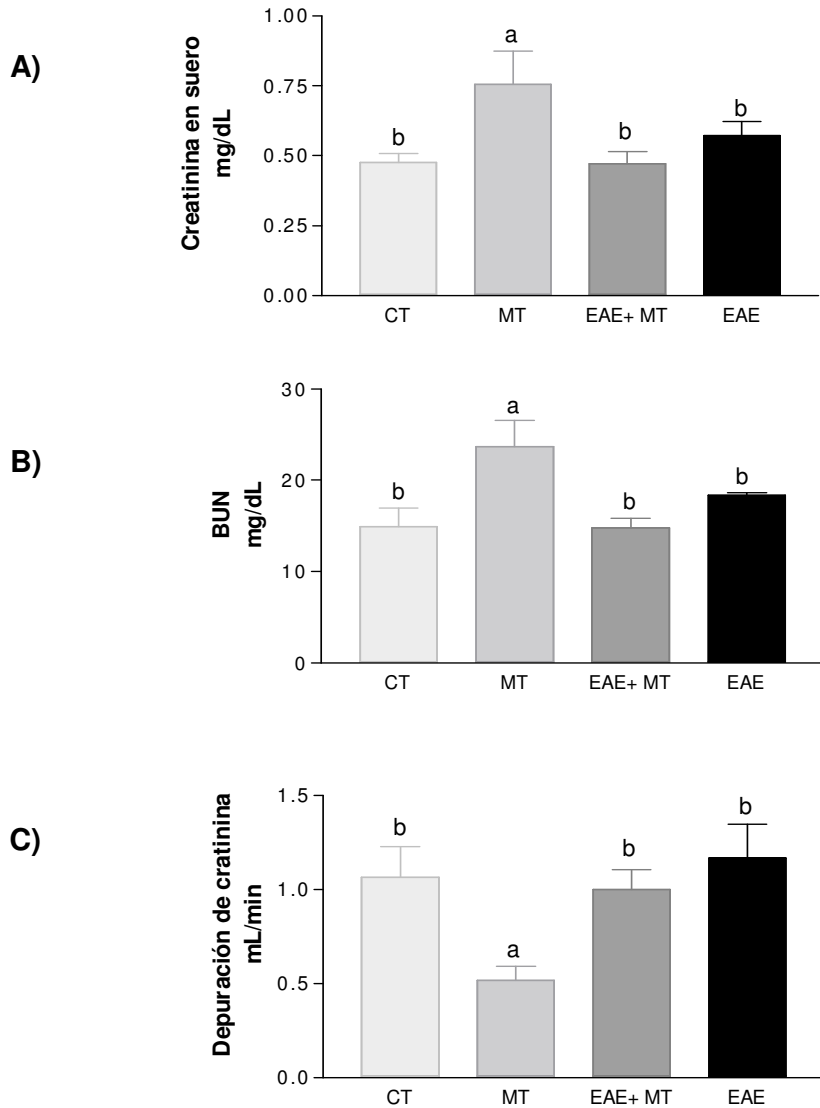
### **Evaluación del efecto del EAE**

Una vez establecida la dosis y la IRA ocasionada por MT, se procedió a evaluar el efecto del EAE.

El EAE se administró 30 min antes del MT y las ratas que no debían administrarse se inyectaron con SSI.

Se determinaron los parámetros bioquímicos de daño glomerular para evaluar el efecto que presentaría el EAE al administrarse en conjunto con el anticancerígeno, de igual forma las ratas fueron sacrificadas por decapitación a

las 48 h; se recolecto la sangre y con ello se evaluó el daño renal mediante la medición de creatinina en suero, depuración de creatinina y nitrógeno de urea en suero.



**Figura 3. Efecto del EAE sobre la disfunción renal inducida por MT (100 mg/kg).** (A) Creatinina en suero (B) Nitrógeno de urea en suero (BUN), (C) Depuración de creatinina. Promedio  $\pm$  EEM.  $n=6-15$ . <sup>a</sup> $P<0.001$  vs MT; <sup>b</sup> $P<0.001$  vs CT.

Considerando los datos mostrados en las gráficas de la Figura 3, es evidente el daño provocado por el MT. Observamos que los parámetros de las ratas control tuvieron valores normales y semejantes a los obtenidos anteriormente;

los niveles de creatinina aumentaron considerablemente en comparación con los niveles de las ratas del grupo CT, por otro lado, las ratas del grupo de MT+EAE tienen niveles semejantes al grupo CT lo que hace evidente una prevención total con la administración del EAE (Figura 3A).

Se observa que MT incrementó el nivel de BUN de las ratas tratadas comparadas con los niveles de las ratas CT, el tratamiento con EAE en las ratas tratadas con MT y EAE (MT + EAE) previno totalmente el incremento encontrado en las ratas tratadas con MT. Las ratas tratadas con EAE presentaron niveles de BUN normales (Figura 3B).

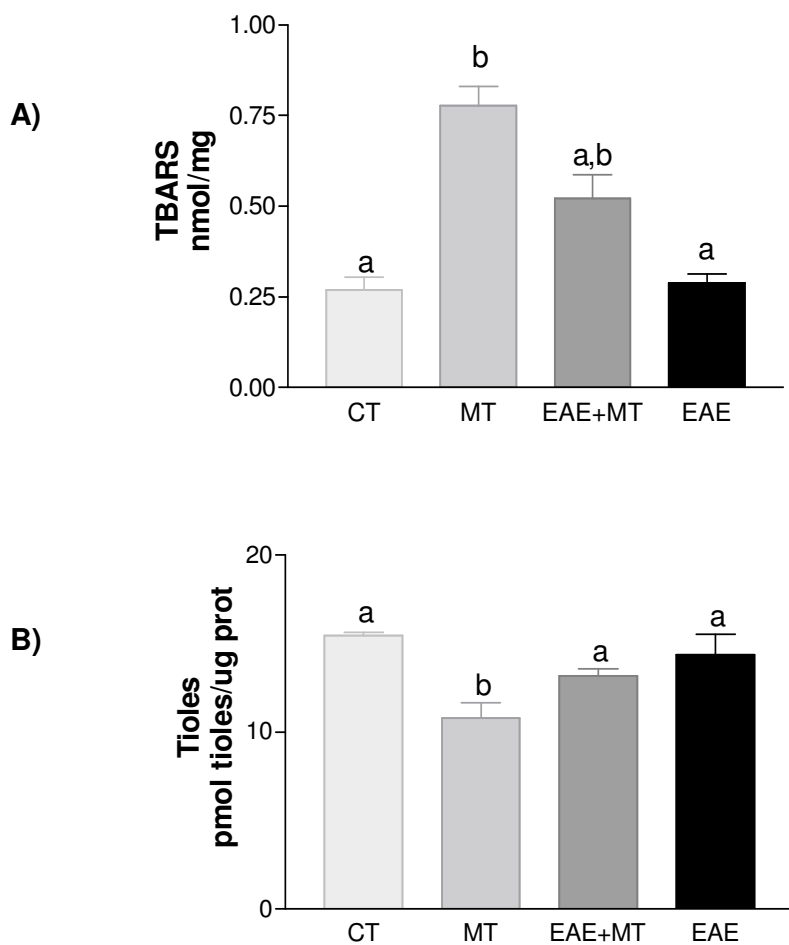
La nefrotoxicidad inducida por metotrexato se hizo evidente al observar el incremento de la creatinina en plasma sanguínea de las ratas tratadas con dicho medicamento en comparación con las ratas control, el aumento en los niveles de creatinina es consecuencia de la disminución en la depuración de creatinina, ya que en las ratas tratadas con MT la depuración disminuyó significativamente en comparación con las ratas CT, en las ratas tratadas con MT+EAE el efecto se previno parcialmente (Figura 3C). La depuración de creatinina en el grupo EAE similar a la del grupo control.

Los parámetros evaluados presentan concordancia entre sí, tanto creatinina como BUN aumentan, mientras la depuración de creatinina disminuye en las ratas tratadas con MT; los valores en el grupo de MT+EAE resultaron iguales a los del grupo CT, por lo que podemos argumentar que la administración del EAE logró prevenir los cambios en creatinina, BUN y depuración de creatinina en las ratas tratadas con MT.

La depuración de creatinina es una manera de medir la velocidad de filtración glomerular, así como el incremento en los niveles de la creatinina y del BUN en plasma sanguíneo, siendo parámetros empleados como marcadores de un daño a nivel de glomérulo (**Pedraza-Chaverri *et al.*, 1999**, **Schoret *et al.*, 1981**) lo que puede estar asociada con la producción de ERO's, ya que estas pueden inducir disminución en la velocidad de filtración glomerular (**Duque *et al.* 1992**).

## Evaluación del estrés oxidante

### Marcadores de estrés



**Figura 4. Efecto del EAE sobre dos marcadores de estrés oxidante. (A)** Determinación de TBARS, **(B)** Determinación de tioles. Promedio  $\pm$  EEM. n=8-14. <sup>a</sup>P<0.05 vs MT; <sup>b</sup>P<0.05 vs CT.

TBARS es un indicador de la peroxidación lipídica, la lipoperoxidación es un marcador de estrés oxidante. En la Figura 4A, podemos observar que las TBARS aumentan en el grupo de MT 3 veces respecto al grupo CT. La lipoperoxidación disminuye de manera significativa en el grupo de EAE+MT pero no es igual al control, lo que nos indica una protección parcial.

Es reconocida la capacidad de los grupos tiol de atrapar radicales libres en forma similar a lo que ocurre con los compuestos fenólicos (**Horieet al., 1992**). En la Figura 4B se observa que el contenido de grupos tioles disminuye en el grupo MT y dicha disminución es prevenida con el EAE.

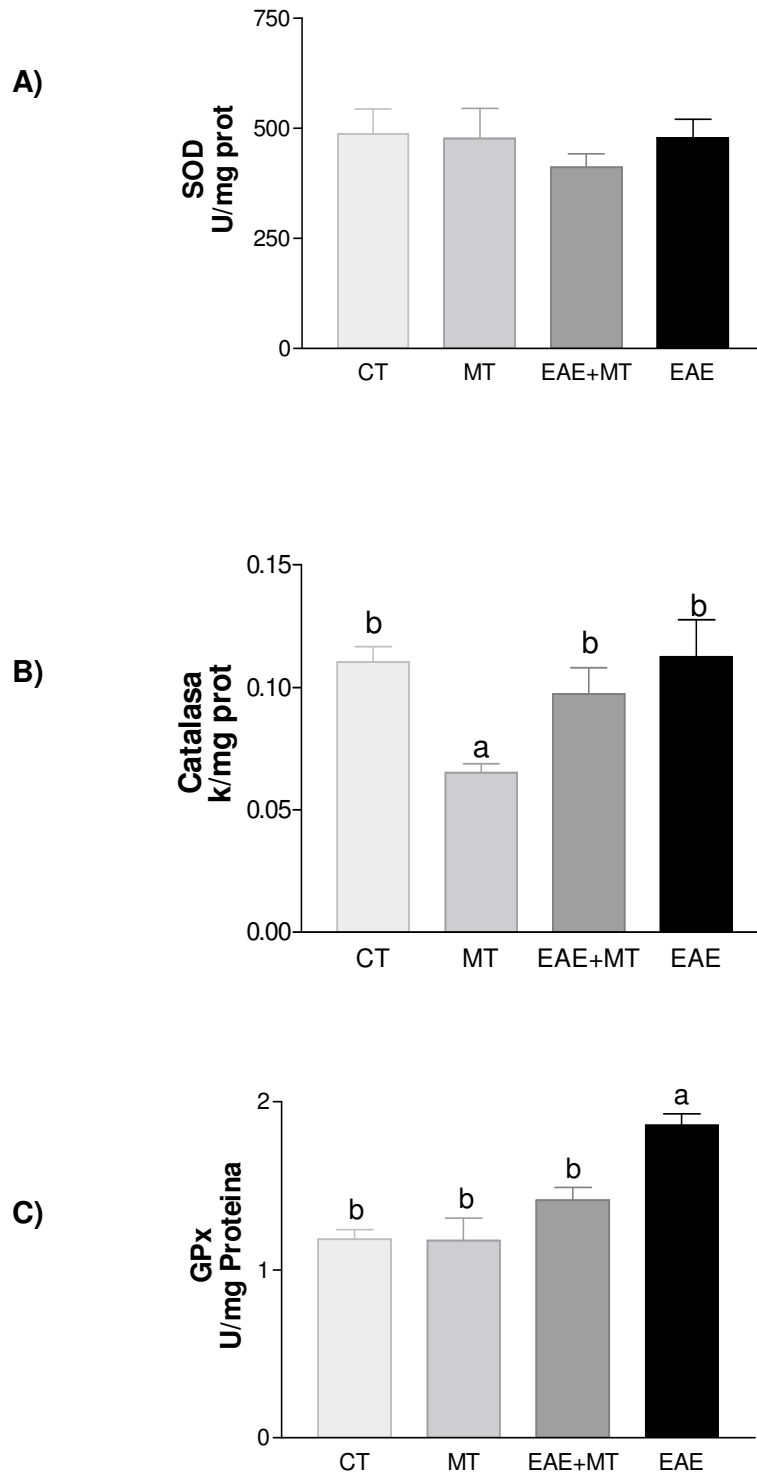
### **Actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón**

El tratamiento con MT no disminuyó la actividad de SOD total en la corteza renal, también se observó que los grupos CT, MT Y EAE presentaron valores muy semejantes entre ellos; el grupo de MT+EAE presentó una ligera disminución pero no fue significativa, por lo que podemos decir que no hubo cambios en la actividad de dicha enzima (Figura 5A).

Con respecto a la actividad de CAT se observó una disminución en el grupo de MT respecto al grupo CT, el grupo de EAE presentó valores muy similares en comparación a los del grupo control; el grupo de la combinación de MT+EAE presentó un ligero aumento con respecto a MT indicando que el EAE ayudó en esta recuperación, presentando así una protección parcial (Figura 5B).

Lo que respecta a la actividad de GPx encontramos que esta aumentó en el grupo tratado con EAE con respecto al grupo CT y MT, en cuanto a los grupos MT, EAE+MT y CT la actividad de la enzima resultó similar (Figura 5C).





**Figura 5. Efecto del EAE sobre la actividad enzimática.** A) Superóxidodismutasa. B) Catalasa. C) Glutati3n per3xidasa. Promedio  $\pm$  EEM. n=4-7. <sup>a</sup>P<0.05 vs MT, <sup>b</sup>P<0.05 vs CT.

## **6. Conclusiones**

Se demostró que el metotrexato provocó la insuficiencia renal aguda a una dosis de 100 mg/kg.

El daño renal por metotrexato fue evidente por daño glomerular y no por daño tubular.

El extracto de ajo envejecido logró prevenir totalmente el daño renal que se indujo por la administración del anticancerígeno.

El metotrexato induce estrés oxidante en riñón pero el extracto de ajo previene parcialmente la producción de TBARS y evita totalmente la disminución de tioles.

El metotrexato abate la actividad de la CAT y el EAE es capaz de evitarlo. El metotrexato no modifica la actividad de SOD y GPx.

## 7. Bibliografía

Aebi HE. 1982. Catalase. En: Methods of Enzymatic Analysis. Verlagchemie, Weimheim.105:121-126.

Aebi HE. 1980. Enzymes 1: oxidoreductases, transferases. In: Methods of enzymatic analysis vol. III Bergmeyer H (Ed). VerlagChemie. Deerfield Beach, Fl: 273-282.

Aguilera P, Cháñez-Cárdenas ME, Maldonado PD. 2007. Recent advances in the use of antioxidant treatments in cerebral ischemia. In: New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective. Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME (eds). Research Signpost. Kerala, India:61-74.

Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. J Nutr; 1131: 955S-962S.

Anderson, S.C. y Cockayne, S. Química Clínica. Mc Graw Hill Interamericana. México, 1995. pp 380-420.

Armstrong, D., and 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.

Augusto O, Bonini M, Amanso AM, Linares E, Santos C, De Menezes S. 2002. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 32:841-859.

Babior BM. 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). N Engl J Med 298:659-668.

Barrera, D., Maldonado, PD., Medina-Campos, ON., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., and Pedraza-Chaverrí, J. 2003. HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Free RadicBiol Med*, 34:1390-1398.

Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426.

Battistoni A, Folcarelli S, Cervoni L, Polizio F, Desideri A, Giartosio A, Rotilio G. 1998. Role of the dimeric structure in Cu, Zn superoxide dismutase, pH-dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *E. coli*. *J BiolChem* 273:5655-5661.

Beckman JS, 1994. Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebrals injury. *Ann N Y AcadSci*; 738: 69-75.

Bickers y Athar, 2006. Bickers DR, Athar M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 126:2565-2575.

Blum J, Fridovich I, 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical *ARC BiochemBiophys*. 240:500-508.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718.

Breen AP, Murphy JA. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free RadicBiol Med*, 18:1033-1077.

Brigelius-Flohé R, Traber MG. 1999. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J* 13:1145-1155.

Burton DR. 1981. Insuficiencia renal aguda En: Burton DR. Fisiología de las enfermedades renales, 3ª ed. España: MacGraw-Hill. 78-91.

Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ. 1992. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *BiochemBiophys Res Commun.* 185:960-966.

Carbajal C.R.C. 2002. Sistema antioxidante enzimático renal en nefrotoxicidad por dicromato de potasio. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 17:164-173.

Cheeseman KH, Slater TF. 1993. An introduction to Free Radic *Biol Med*, 49:481-493.

Cheng, L., Kellogg, EW, and Packer, L. 1981. Photoinactivation of catalase. *Photochem Photobiol*, 34, 125-129.

Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. 2006. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Invest Clin.* 58:350-358.

Czapski G, Goldstein S. 1995. The role of the reactions of .NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach. *Free Radic Biol Med*, 19:785-794.

Deno H, Kato A, Shinozaki K, Sugiura M. 1982. Nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for elongation factor 1A and tRNA<sup>Val</sup> (UAC): the tRNA<sup>Val</sup> (UAC) gene contains a long intron. *Nucleic Acids Res* 10:7511-7520.

Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ. 1994. Renal failure and ephrotoxic drug-induced disturbances in rat kidney tissue. *Ren Fail* 16:687-696.

Dillon SA, Burmi RS, Lowe GM, Billington D Rahman K. 2003. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sci* 72:1583-1594.

Duque I, García-Escribano C, Rodríguez-Puyol M, Díez-Marquéz ML, López-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodríguez-Puyol D. 1992. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 263:F466-F473.

Durak I, Aytac B, Atmaca Y, Devrim E, Avci A, Erol C, Oral D. 2004. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Life Sci* 75:1959-1966.

Eberhardt E. 2001. Cultural and medical history of snoring. How to fell trees during sleep. *MMW Fortschr Med* 143:1-53.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jügens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 13:341-390.

Freeman BA, Crapo JD. 1996. Radicals generated by bone cutting and fracture. *Free Radic Biol Med* 20:831-835.

Frei B. 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97:5S-13S.

Geneser F. 2000. Histología. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 3<sup>era</sup> edición. Pp 555-560.

Goodmann and Gilman. 2007. Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 9ª edición. Pp 1316, 1319, 1332-1334, 1811.

Grazioli V, Schiavo R, Casari E, Marzatico F, Rodriguez y Baena R, Gaetani P. 1998. Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage. *FEBS Lett* 431:149-153

Greenwald, R. A. 1990. Current approaches to the development of oxygen radical scavengers. *Drugs of Today*.26(5): 299-307.

Gutteridge JM. 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *ChemBiolInteract*. 91:133-140.

Guyton. 1997. Tratado de Fisiología Médica. McGraw Hill Interamericana, 9ª ed. pp 296-301.

Halliwell B, and Gutteridge JMC. 2001. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publications. Nueva York. 3ª edición. USA. Pp 106, 262-315.

Halliwell B and Gutteridge JMC. 2006. Free radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721-724.

Halliwell B and Gutteridge JMC. 1999. Oxygen is a toxic gas-an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species, and, Antioxidant defences. In: *Free Radic Biol Med*, Oxford, University Press. 3a ed. USA. Pp. 7-35, 106, 107.

Hansberg W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* Vol XXVI:19-54.

Ho SE, Ide N, Lau BH. 2001. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine*. 8:39-46.

Horie, T., Awazu, S., Itakura, Y. y Fuwa, T. 1992. Identified diallylpolysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med*. 58:468-469.

Janero, D. 1998. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 9, 515-540.

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.

Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidante. Aplicaciones médicas. México: El Manual Moderno. 319-327.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6348-6352.

Lawson LD. 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: *Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity*. ACS Symposium Series 691. Lawson LD, Bauer R (eds). American Chemical Society. Washington, DC, USA:176-209 .

Leah RB, Casareno DW, Gitlin JD. 1998. The cooper chaperone CCS directly interacts with cooper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 273:23625-23628.



Lefevre, G. 1998. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annals de Biologie Clinique*, 56, 305-319.

Loftus JP, Belknap JK, Stankiewicz KM, Black SJ. 2007. Laminar xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the prodromal stage of black-walnut induced equine laminitis. *EquineVet J* 39:48-53.

López LM. 2007. El ajo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM* 26:78-81.

Lowry OA, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J BiolChem* 193:267-275.

Mac Millan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. 1998. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37:1613-1622.

Maldonado PD. 2000. Nefrotoxicidad por gentamicina. Efecto protector del ajo y su relación con superóxidodismutasa. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México.

Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J. Aged garlic extract attenuates gentamicin induced renal damage and oxidative stress in rats. *LifeSci* 2003; 73:2543-2556.

Maldonado PD, Chanez-Cardenas ME, Pedraza-Chaverri J. 2005. Aged garlic extract, garlic powder extract, S-allylcysteine, diallyl sulfide and diallyl disulfide do not interfere with the antibiotic activity of gentamicin. *Phytother Res* 19:252-254.

Maldonado PD, Limón D, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverri J. 2009. Medicinal properties of garlic: Importance of its antioxidant activity. En; *Garlic consumption and Health Research*. Editors: MihailPăcurar and

Gavril Krejci. Capitulo 2, pp 61-118. Nova Science Publishers, ISBN: 978-1-60741-692-5.

Mancuso C, Scapagini G, Curro D, Giuffrida S. AM, De Marco C, Butterfield DA, Calabrese V.2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* 12:1107-23.

Massieu L. 1999. Muerte por isquemia y anoxia. En: Enfermedades neurodegenerativas mecanismos moleculares. Pasantes H, Arias C, Massieu L, ZentellaA, Tapia R (eds). Fondo de Cultura Económica. México D.F:64-92.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nuñez De Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochem* 32:595-603.

Meier B, Scherk C, Schmidt M, Parak F. 1998. pH-dependent inhibition by azide and fluoride of the iron superoxide dismutase from *Propionibacteriumshermanii*. *Biochem J* 331:403-407.

Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. 1991. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo.*ProcNatlAcadSciUSA* 88:2166-2170.

Mullineaux PM, Creissen GP. 1997. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants. Scandalios JG (ed). ColdSpringHarbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA:667-713.

Munday JS, James KA, Fray LM, Kirkwood SW, Thompson KG. 1999. Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against in vitro oxidation. *Atherosclerosis* 143:399-404.

Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. 1989. Isolation and characterization of the rat catalasa-encoding gene. *Gene* 79:279-288.

Neal GE, Moss EJ, Manson MM. 1988. Glutathione conjugation in oncogenesis. In: *Glutathione Conjugation*. Sies H, Ketterer B (eds.). Academic Press, New York:281–314.

Neuzil, J., Gebicki, J. M. y Stocker, R. 1993. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem. J.* 293: 601-606.

Oberley, L., & Spitz, D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*, 105, 457-464.

Oury TD, Crapo JD, Valnickova Z, Enghild JJ. 1996. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* 317:51-57.

Palamanda, J. y Kehrer, J. 1992. Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 293(1):103-109.

Patel V, Luft FC, Yum MN, Patel B, Zeman W, Kleit SA. 1975. Enzymuria in gentamicin-induced kidney damage. *Antimicrob Agents Chemother* 7:364-369.

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.

Pedraza-Chaverri J, Granados-Silvestre MA, medina-Campos ON, Hernández-Pando R. 1999. Effect of the *in vivo* catalase inhibition on aminonucleosid nephrosis. *Free Radical Biol Med*; 27:245-253.

Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Avila-Lombardo R, Berenice Zuniga-Bustos A, Orozco-Ibarra M. 2006. Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *LifeSci* 78:761-770.

Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Segoviano-Murillo S. 2007. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food Chem Toxicol* 45:622-627.

Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A. 1995. NO<sub>2</sub> reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med* 19:553-563.

Price VE, Sterling WR, Tarantola VA, Hartley RW, Rechcigl M. 1962. The kinetics of catalase synthesis and destruction *in vivo*. *J Biol Chem* 237:3468-3475

Rahman K, Lowe GM. 2006. Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J. Nutr.* 136: 736S-740S.

Rikans LE, Hornbrook KR. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1362:116-127

Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 1994. 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem* 269:19163-19166.

Santos NA, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox

state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol* 81:173-182.

Sato T, Miyata G. 2000. The nutraceutical benefit, part IV: Garlic. *Nutrition* 16:787-788.

Sawyer DT. 1988. The redox thermodynamics for dioxygen species ( $O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HOO^{\cdot}$ ,  $HOOH$ , and  $HOO^-$ ) and monooxygen species ( $O$ ,  $O^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ , and  $OH^-$ ) in water and aprotic solvents. *Basic Life Sci* 49:11-20.

Schrier R W. 1999. Atlas of Diseases of the Kidney. Department of Medicine, University of Colorado School of Medicine Denver.

Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. 1981. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 19:288-299.

Sies H, Mehlhorn R. 1986. Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch Biochem Biophys* 251:393-396.

Stroppolo ME, Sette M, O'Neill P, Polizio F, Cambria MT. 1998. Cu, Zn superoxide dismutase from *Photobacteriumleignathi* is an efficient enzyme. *Biochemistry* 37:12287-12292.

Symons MC. 1991. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91:2S-13S.

Sun E, Xu H, Liu Q, Zhou J, Zuo P, Wang J. 1995. The mechanisms for the effect selenium supplementation on immunity. *Biol Trace Elem Res* 48:231-238.

Takasu J, Uykim pang R, Sunga MA, Amagase H, Niihara Y. 2002. Aged garlic extract therapy for sickle cell anemia patients. *BMC Blood Disord* 2:1-4.

Thornalley, P. J. y Vasak, M. 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.* 827:36-44.

Toledo I, Noronha-Dutra AA, Hansberg W. 1991. Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 173:3243-3249.

Tresseler KM. 1998. Laboratorio clínico y pruebas diagnósticas. México: El manual moderno, 336-338.

Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552:335-344.

Velázquez, M., Prieto, B., & Contreras, R. 2004. El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*, 75, 36-43.

Wardman P, Candeias LP. 1996. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 145:523-531.

Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SR. 2003. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *ClinSci* 105:425-430.

Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, Kim PM, Laposa RR, McCallum GP, Nicol CJ, Parman T, Wiley MJ, Wong AW. 2005. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol* 207:354-366.

Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. 1976a. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 69:85-91.

Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. 1976b. Renal damage caused by gentamicin: A study of the effects on renal morphology and urinary enzyme excretion. *J Pathol* 118: 171-182.

Wolff, S. P., Garner, A. y Dean, R. T. 1986. *Free radicals*, lipids and proteindegradation. 11:27-31.

Yagi, K. 1998. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, 101-106, 108.

Yoshida S, Hirao Y, Nakagawa S. 1984. Mutagenicity and cytotoxicity tests of garlic. *J ToxicolSci* 9:77-86.

Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *PhysiolRev* 74:139-162.

Zanón, V. 2008. Estrés oxidante en el glaucoma primario de ángulo abierto. Prevención de la ceguera por glaucoma. *Server de publicaciones*, 27-30.

Zhou J, Xing D, Chen Q. 2006. Enhancement of fluoresceinylcypridinaluciferin analog chemiluminescence by human serum albumin for singlet oxygen detection. *PhotochemPhotobiol* 82:1058-1064.