



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO PROTECTOR DE LA S-ALIL
CISTEÍNA EN LA NEFROPATÍA DIABÉTICA
EN RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

MARÍA ANTONIETA RAMOS VEGA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE Profesora: Marina Gavilanes Ruíz

VOCAL Profesor: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

SECRETARIO Profesora: Diana Barrera Oviedo

1° SUPLENTE Profesora: María Eva González

2° SUPLENTE Profesora: Martha Patricia Neri Paez

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

FINANCIAMIENTO: Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN205310 y
PAPIIT IN211713

ASESOR DEL TEMA: Dra. Diana Barrera Oviedo _____

SUSTENTANTE: María Antonieta Ramos Vega _____

Agradecimientos

A la Dra. Diana Barrera por la asesoría, conocimientos y consejos en la realización de este trabajo.

A la Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez por proporcionar la S-alil cisteína.

A los chicos del laboratorio, Gaby y Oscar por el apoyo brindado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química por proporcionarme tanto, por ser mi segundo hogar estos años y permitirme ser orgullosamente parte de ella.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Abreviaturas | 3 |
| 2. Resumen | 4 |
| 3. Marco teórico | |
| 3.1. Riñón | |
| 3.1.1. Anatomía | 6 |
| 3.1.2. Función | 6 |
| 3.2. Insuficiencia Renal Aguda (IRA) | 6 |
| 3.3. Diabetes Mellitus (DM) | 7 |
| 3.3.1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) | 8 |
| 3.3.2. Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) | 8 |
| 3.3.3. Nefropatía diabética (ND) | 9 |
| 3.3.4. Inducción química en animales | 10 |
| 3.4. Estrés oxidante | 12 |
| 3.4.1. Especies Reactivas de oxígeno (ERO) | 12 |
| 3.4.1.1. Exógenos | 13 |
| 3.4.1.2. Endógenos | 13 |
| 3.4.2. Características de las principales ERO | |
| 3.4.2.1. Anión superóxido($O_2^{\cdot-}$) | 14 |
| 3.4.2.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) | 14 |
| 3.4.2.3. Radical hidroxilo (OH.) | 14 |
| 3.4.2.4. Oxígeno singulete ($1O_2$) | 15 |
| 3.5. Antioxidantes en el sistema biológico | 16 |
| 3.5.1. Antioxidante enzimático | 16 |
| 3.5.2. Antioxidante no enzimático | 18 |
| 3.6. Ajo como antioxidante | 19 |
| 3.6.1. Extracto de ajo envejecido (EAE) | 22 |
| 3.6.2. S-alil cisteína (SAC) | 22 |
| 4. Justificación | 24 |
| 5. Hipótesis | 25 |
| 6. Objetivo general | 25 |
| 7. Objetivos particulares | 25 |
| 8. Materiales y Métodos | |

| | |
|---|----|
| 8.1. Reactivos | 26 |
| 8.2. Antioxidante (SAC) | 26 |
| 8.3. Fármaco (STZ) | 26 |
| 8.4. Sujetos experimentales | 26 |
| 8.5. Diseño experimental | 27 |
| 8.6. Muestras | 28 |
| 8.7. Evaluación de DM | |
| 8.7.1. Parámetros Bioquímicos | |
| 8.7.1.1. Glucosa | 29 |
| 8.7.1.2. Colesterol | 30 |
| 8.7.1.3. Triglicéridos | 31 |
| 8.8. Evaluación de la IRA | |
| 8.8.1. Función tubular | |
| 8.8.1.1. Cuantificación de proteínas en orina | 31 |
| 8.8.2. Función glomerular | |
| 8.8.2.1. Creatinina en suero | 32 |
| 8.8.2.2. Depuración de creatinina | 33 |
| 8.8.2.3. Nitrógeno de la urea en el suero sanguíneo | 33 |
| 8.8.3. Estructura renal | |
| 8.8.3.1. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) | 34 |
| 8.8.3.2. Análisis histológico | 34 |
| 8.9. Evaluación del estrés oxidante | |
| 8.9.1. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón | |
| 8.9.1.1. Actividad de la enzima superóxido dismutasa total (SOD) | 35 |
| 8.9.1.2. Actividad de catalasa (CAT) | 35 |
| 8.9.1.3. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) | 36 |
| 8.10. Análisis Estadístico | 36 |
| 9. Resultados y discusión | 37 |
| 10. Resumen de Resultados | 53 |
| 11. Conclusión | 54 |
| 12. Referencias | 55 |

1. Abreviaturas

| | | | |
|------------------------|---------------------------------|------------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico | NAD⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado |
| ADP | Adenosín difosfato | NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido reducido |
| ASB | Albúmina sérica bovina | NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| ATP | Adenosín trifosfato | NBT | Azul de nitrotetrazolio |
| BUN | Nitrógeno de urea en sangre | ND | Nefropatía diabética |
| Ca²⁺ | Ión calcio | P | Promedio |
| CAT | Catalasa | PT | Proteínas totales en orina |
| CS | Creatinina en suero | SAC | S-alil-cisteína |
| CT | Grupo control | SAMC | S-alil-mercaptocisteína |
| DC | Depuración de creatinina | SOD | Superóxido dismutasa |
| DADS | Dialildisulfuro | SSI | Solución salina isotónica |
| DAS | Dialilsulfuro | STZ | Estreptozotocina |
| DATS | Dialiltridulfuro | RI | Resistencia a la insulina |
| DM | Diabetes mellitus | RL | Radical libre |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 | UV | Ultravioleta |
| DO | Densidad óptica | XOR | Xantinaoxidorreductasa |
| EAE | Extracto de ajo envejecido | Å | Ångström |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético | α | Alfa |
| EEM | Error estándar de la muestra | β | Beta |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno | γ | Gamma |
| GLUT2 | Transportador de glucosa dos | Δ | Delta |
| GPX | Glutación peroxidasa | Σ | Sigma |
| GR | Glutación reductasa | | |
| GSH | Glutación reducido | | |
| GSSG | Disulfuro de glutación | | |
| IRA | Insuficiencia renal aguda | | |
| IRC | Insuficiencia renal crónica | | |
| LDH | Lactato deshidrogenasa | | |
| n | Tamaño de la muestra | | |

2. Resumen

El riñón es un órgano regulador encargado de remover del organismo los productos terminales del metabolismo de las células, regular la presión sanguínea y retener sustancias esenciales para la supervivencia de los individuos. La insuficiencia renal aguda (IRA) es un padecimiento que se caracteriza por un abrupto descenso de la función renal, trayendo como consecuencia la acumulación de productos de desecho de nitrógeno en sangre, como el nitrógeno de urea (BUN) y la creatinina (CS).

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de trastornos que se caracteriza por grados variables de resistencia a la insulina (RI), menor secreción de dicha hormona y mayor cantidad de glucosa en sangre. Diversos defectos en la acción, secreción o ambas funciones de la insulina originan hiperglucemia en la DM. La nefropatía diabética es una de las complicaciones más frecuentes de la DM, y la IR se suele atribuir a consecuencias metabólicas de la regulación anormal de la glucosa.

Dentro de los modelos para inducir DM en roedores se encuentran los que emplean agentes químicos como la estreptozotocina (STZ). Este compuesto en dosis diabetogénicas actúa específicamente sobre las células β pancreáticas. Una dieta alta en grasas ocasiona RI y obesidad en ratas.

Se ha demostrado que el extracto de ajo envejecido (EAE) mejora del perfil de colesterol, disminuye los niveles de triglicéridos. La S-alil-cisteína (SAC) es uno de los compuestos azufrados del ajo, tiene actividad antioxidante y efecto reno protector, entre otros.

El presente estudio tiene como finalidad investigar la capacidad del antioxidante SAC para disminuir el daño renal causado por la DM. Se estableció un modelo con daño pancreático por STZ en ratas macho Wistar con dieta hipercalórica (alta en grasas y carbohidratos) y se evaluó la capacidad del SAC para disminuir el daño en dicho modelo.

Se obtuvo un modelo de diabetes asociado a dieta hipercalórica, en el que observamos poliuria, polifagia, polidipsia, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia y daño renal (aumento de creatinina y disminución de la depuración de creatinina).

La SAC contribuye a disminuir los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos; evita el cambio de la actividad de enzimas antioxidantes y evita parcialmente el daño renal funcional y estructural.

3. Marco teórico

3.1. Riñón

3.1.1. Anatomía

El riñón es un órgano par, ubicado en la parte posterior del abdomen a ambos lados de la columna vertebral, paralelos a la última vértebra torácica y las tres primeras vértebras.

3.1.2. Función

El riñón dispone de un abundante flujo sanguíneo para llevar a cabo todas sus funciones básicas (**Schrier et al., 2003**), algunas de ellas son:

- Separar la mayor parte de los productos de excreción metabólica del organismo y sustancias extrañas.
- Participar en la regulación del volumen del líquido extracelular y de la cantidad total del agua en el organismo.
- Controlar el equilibrio ácido-base y la concentración de la mayor parte de los componentes del organismo.
- Secretar 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 (función endocrina) (**Geneser, 2000**).
- Síntesis de glucosa a partir de los aminoácidos y de otros precursores en situaciones de ayuno prolongado (**Guyton, 1997**).

3.2. Insuficiencia renal aguda (IRA)

Para el adecuado funcionamiento renal son necesarias tres premisas: adecuada perfusión sanguínea, integridad del parénquima renal y permeabilidad de las vías excretoras. La alteración súbita de estos elementos puede ocasionar un deterioro de la función renal denominado insuficiencia renal aguda (IRA). La IRA es un síndrome clínico secundario a múltiples etiologías que se caracteriza por un deterioro brusco de la función renal y cuya expresión común es un aumento de la

concentración de los productos nitrogenados en sangre (urea, creatinina, ácido úrico, etc.) (**Schrier et al., 2004; Hernando, 2009**).

La IRA se clasifica en tres categorías dependiendo de su origen:

1. Pre-renal, enfermedad caracterizada por una hipoperfusión renal en la cual la integridad del tejido renal es preservada. La filtración glomerular es corregida rápidamente una vez restaurada la perfusión renal y la presión de ultrafiltración.

2. Intrínseca, enfermedad donde se ve comprometido el tejido renal. Desde el punto de vista clínico patológico se clasifica en: enfermedades que involucran vasos renales grandes, enfermedades de la microvasculatura y el glomérulo, necrosis tubular aguda, isquémica y nefrotóxica y otros procesos que involucran al intersticio.

3. Post-renal, enfermedad asociada con una obstrucción aguda del flujo urinario entre la uretra y el cuello de la vejiga o una obstrucción bilateral de los uréteres.

La IRA intrínseca ocasionada por nefrotóxicos es frecuentemente llamada Necrosis Tubular Aguda (NTA), se caracteriza por la generación de una serie de alteraciones estructurales y moleculares de las células tubulares, como la aparición de especies reactivas de oxígeno (ERO) (**Rovin et al., 1990; Baud y Ardailou, 1993**), disminución o desaparición de los procesos de absorción y excreción, incremento de Ca^{2+} citosólico, descenso en los niveles de ATP y ADP, acidosis intracelular y abultamiento de las células epiteliales, que junto con restos necróticos de estas células, contribuyen a la obstrucción tubular (**Sánchez, 1993; Brenner, 2000**).

3.3. Diabetes Mellitus (DM)

La DM es un grupo de alteraciones caracterizadas por hiperglucemia crónica asociada a una acción inadecuada de la insulina, acompañada por una variedad de alteraciones bioquímicas y manifestaciones clínicas cuya naturaleza y gravedad dependen de la patología subyacente al estado diabético, del grado de deficiencia de insulina, factores ambientales y del daño progresivo de órganos y tejidos.

Actualmente la diabetes se clasifica en:

1. Diabetes tipo 1. Anteriormente conocida como Diabetes Mellitus Insulino-dependiente, incluye las formas de diabetes por destrucción de las células β causada por alteraciones inmunológicas o idiopática.

2. Diabetes tipo 2. Conocida anteriormente como Diabetes Mellitus no insulino-dependiente, hay resistencia tisular a la acción de la insulina y, eventualmente, deficiencia en la secreción de esta hormona.

3. Otros tipos de diabetes. Inducida por defectos genéticos a nivel de las células β del páncreas que son heredados en forma autosómica dominante o a nivel de alteraciones en la estructura de la molécula de insulina, por enfermedades del páncreas exócrino, por endocrinopatías, por drogas capaces de inducir el estado diabético, por infecciones, por medicación inmunológica o por síndromes asociados a la enfermedad.

4. Diabetes gestacional. Comienza en el embarazo y desaparece después del parto. En estos casos, el efecto de la insulina es bloqueado parcialmente por hormonas antagonistas producidas por la placenta a partir de la vigésimo cuarta semana de la gestación humana (**Cabrera et al., 2000**).

3.3.1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)

La diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por una deficiencia absoluta de secreción de insulina, que se debe a la destrucción autoinmune de las células β . Suelen ser jóvenes (niños o adolescentes) y no obesos cuando sufren los primeros síntomas. Si no son tratados con insulina, los pacientes mueren como consecuencia de una cetoacidosis diabética.

3.3.2. Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)

La diabetes mellitus tipo 2 es un trastorno heterogéneo caracterizado por un deterioro progresivo de la acción de la insulina (resistencia a la insulina), seguido por la incapacidad de las células β para compensar las RI (disfunción de las células β pancreáticas). La RI es un defecto metabólico que precede a la disfunción de las células β y se relaciona principalmente con la resistencia a la utilización de glucosa

mediada por insulina en la periferia y la hiperinsulinemia compensatoria. Para compensar la RI, las células β secretan mayores cantidades de insulina y con esto mantienen la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, con el curso del tiempo, la función de las células β se ve afectada, lo que conduce a un deterioro en la homeostasis, tolerancia a la glucosa y subsiguiente desarrollo de diabetes **(Srinivasan et al., 2005)**.

Por lo que la predisposición genética, el envejecimiento, la obesidad, la dietética y una vida sedentaria son los principales factores de riesgo implicados en el desarrollo de DM2.

3.3.3. Nefropatía Diabética (ND)

La diabetes es la principal causa de Insuficiencia Renal Crónica (IRC) en todo el mundo **(Atkins & Zimmet , 2010)** y esta a su vez es la principal causa de la ND.

La ND puede aparecer tanto en DM1 como en DM2. Se conoce mejor la epidemiología de la DM2 porque generalmente se puede precisar el comienzo clínico, pero no hay diferencias sustanciales entre ambos tipos en cuanto a hemodinámica, morfología renal y progresión de la nefropatía establecida.

En la DM1 las primeras manifestaciones clínicas de ND aparecen después de 5 a 10 años que ha iniciado la enfermedad. La incidencia de ND aumenta considerablemente, alcanza un pico entre los 15 y 18 años y después disminuye. Es raro que aparezca nefropatía con menos de 10 años de evolución diabética o después de 30. La incidencia acumulativa es del 40% a los 40 años de enfermedad **(Navarro, 2003)**.

La nefropatía evoluciona por varias fases: 1) fase temprana de anormalidades fisiológicas de la función renal conocida como microalbuminuria, 2) fase clínica con proteinuria persistente y 3) etapa final de insuficiencia renal **(Revilla & Islas, 2005)**

La ND inicia con un excesivo depósito de proteínas de matriz extracelular en el mesangio y en la membrana basal de los glomérulos (glomeruloesclerosis), y cambios funcionales, el primer cambio es la hiperfiltración glomerular, tanto en el

compartimiento glomerular como tubular, con paso de albumina al filtrado glomerular y por tanto a la orina.

En la microalbuminuria, la depuración de albúmina se encuentra incrementada, esto es debido a un aumento en la presión trans-glomerular favoreciendo el incremento en la filtración de proteínas independientemente de su carga.

Existen varios factores que explican la presencia de la proteinuria. El primero es un efecto en la selectividad del tamaño y las alteraciones de la permeabilidad del glomérulo. Esto ocurre en una población de poros grandes, con poca selectividad, que determina el aumento de la fracción de filtración para moléculas mayores a 46 Å; permitiendo el paso de proteínas plasmáticas grandes a la orina.

El segundo es la permeabilidad y la selectividad, que se modifican por una disminución de las cargas negativas de la pared capilar glomerular y por una reducción del ácido siálico y de heparan sulfato, principales componentes de la barrera **(Revilla & Islas, 2005)**.

3.3.4 Inducción química en animales

Existen diferentes sustancias capaces de producir diabetes en animales para usarse como modelo de diabetes:

1. Sustancias con efectos citotóxicos irreversibles en las células β del páncreas.
2. Sustancias que actúan sobre las células β del páncreas produciendo un efecto citotóxico reversible.
3. Sustancias que aumentan los requerimientos endógenos de insulina debilitando al páncreas, produciendo diabetes.

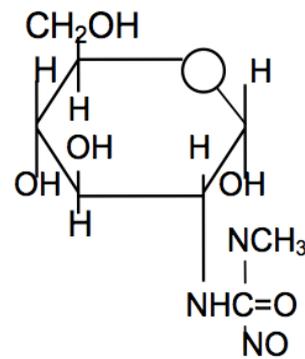
Los agentes químicos más utilizados en la inducción de diabetes son la aloxana y la estreptozotocina (STZ), ya que en bajas dosis causan una parcial reducción de la masa de células β , lo cual puede aprovecharse para producir un estado diabético sin tendencia a la cetosis **(Hugues et al., 2002)**.

La STZ ha demostrado ser más efectiva que la aloxana y es el agente más utilizado para producir diabetes experimental, ya que tiene mayor actividad

citotóxica, pero la sensibilidad varía según la especie animal, la línea, el sexo, la edad y el estado nutricional. (**Hugués et al., 2002**).

La STZ es un antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces achromogenes*, utilizado como agente antitumoral y diabetogénico. Presenta una citotoxicidad específica *in vivo* sobre las células β del páncreas sin afectar otros tejidos. Presenta una cadena de metil nitrourea unida a la posición C2 de la D-glucosa (esquema 1).

Produce la degeneración de los islotes de Langerhans, a bajas dosis, puede ocasionar daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y provocar apoptosis de las células β del páncreas, a dosis mayores, la forma predominante de muerte celular producida es la necrosis (**Batell et al., 1999**). La STZ se une a las membranas de las células β del páncreas. El reconocimiento de la STZ se da por un receptor específico en la superficie de las células β (mayor afinidad por el anómero α de la parte glucosamina), el transportador de glucosa 2 (GLUT2). Una vez dentro de la célula, ocurren tres fenómenos responsables de la muerte de la célula β .



Esquema 1: Estructura de la Estreptozotocina

1. Proceso de metilación. El efecto deletero de la STZ resulta de la degeneración reactiva de los iones carbonio (CH_3^+) formados por la descomposición de las bases de ADN en varias posiciones (**Baynes & Torpe, 1999**).

2. Formación de radicales libres. El peróxido de hidrógeno puede ser producido por los islotes del páncreas después de la exposición de la estreptozotocina (**Papaccio et al., 1986; Mcintosh & Pederson, 1999**).

3. Generación de óxido nítrico (ON). Aún no está claro el mecanismo de acción que conduce a la generación de óxido nítrico, sin embargo, dicha producción generada por STZ, parece estar involucrada en la citotoxicidad hacia células β (**Batell et al., 1999; Mcintosh & Pederson, 1999**).

Bedoya y colaboradores han propuesto una hipótesis para explicar el mecanismo de acción de la STZ, a través de la producción de superóxido que

genera superoxinitritos. Estos a su vez, se disocian en óxido nítrico y radical hidroxilo que dañan el ADN de la célula β produciendo apoptosis.

3.4. Estrés oxidante.

El estrés oxidante es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes (**Betteridge, 2000**). Generando un deterioro en las macromoléculas por el rompimiento o la modificación de su estructura, estas especies reactivas pueden causar un daño celular por peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas con grupos sulfidrilo, entrecruzamiento y oxidación de proteínas, y alteración del ADN (**Rhun et al., 1998**), produciendo una alteración en la función celular o incluso la muerte.

3.4.1. Especies Reactivas de oxígeno (ERO)

Las 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 ERO, su toxicidad radica en que a partir de ellas se generan especies mucho más reactivas como el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y el oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$). Cuando el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se reduce con metales divalentes como el hierro y el cobre acepta un electrón no apareado produciendo el HO^{\bullet} por la reacción de Fenton (**reacción 2**). El $^1\text{O}_2$ se genera por la excitación del dioxígeno, la dismutación espontánea de $\text{O}_2^{\bullet -}$ y la descomposición de H_2O_2 . El $^1\text{O}_2$ y el HO^{\bullet} reaccionan rápidamente con ADN, proteínas y lípidos produciendo daños y cambios estructurales en las células que muchas veces son irreversibles.

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 (**Symons, 1991**).

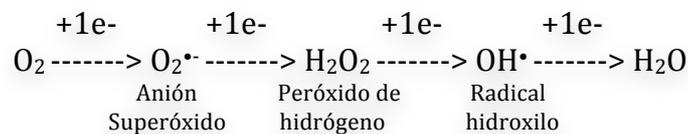
Por lo que la presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva. Por lo tanto, a concentraciones elevadas estas especies son tóxicas para la célula y los tejidos (**Bast et al., 1982**). Los radicales libres pueden ser de origen endógeno o exógeno (**Frei, 1994; Freeman y Crapo, 1996**).

3.4.1.1. Exógenos

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

3.4.1.2. Endógenos

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



Reacción 1. Reducción univalente del oxígeno

- La xantinaoxidorreductasa (XOR) puede existir en 2 formas funcionalmente distintas: xantina deshidrogenasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺) y que produce nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y urato; ésta puede transformarse en xantina oxidasa, dependiente de oxígeno originando O₂^{•-} y H₂O₂ (**Loftus et al., 2007**).
- Los fagocitos activados poseen diversas enzimas como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y sintasa que generan ERO que matan a los microorganismos extraños que ingresan al organismo (**Babior, 1978**).

3.4.2. Características de las principales ERO

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

Primera especie reactiva formada durante el proceso de reducción univalente del oxígeno. En condiciones normales esta especie es producida en bajas concentraciones por distintos sistemas enzimáticos, tales como el sistema xantina/xantina oxidasa (**Lou et al., 2001**); la lipooxigenasa (**Takano et al., 2001**); la ciclooxigenasa (**Rieger et al., 2002**); y la NADPH oxidasa (**Li et al., 2002**); siendo las cadenas transportadoras de electrones la fuente de generación de mayor importancia (**Nordberger & Arnér, 2001**; **Sauer et al., 2001**). El $O_2^{\cdot-}$ juega un papel central como un intermediario de las especies reactivas que son formadas subsecuentemente, debido a que puede oxidar al ácido ascórbico, reducir a los complejos de hierro tal como el citocromo c y el ácido férrico- etilendiamino-tetraácetico (Fe^{3+}), dando como resultado la formación de otras especies reactivas como el H_2O_2 (**Arouma, 1996**; **Diplock et al., 1998**; **Xiong et al., 2007**).

3.4.2.2. Peróxido de hidrógeno (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 $O_2^{\cdot-}$ (por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), 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-bisfosfatasa (**Hansberg, 2002**).

3.4.2.3. Radical hidroxilo (OH^{\cdot})

Debido a que su tiempo de vida media estimada es de 10^{-9} s (**Arouma, 1996**), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) es considerado como el oxidante más potente en los sistemas biológicos, ya que reacciona de manera rápida con casi todas las moléculas biológicas (**Liochev & Fridovich, 1994**). La generación de esta especie

reactiva se ve favorecida por la presencia de metales de transición, mediante la reacción de Fenton **(1894)**:



Reacción 2. Reacción de Fenton.

También se puede generar por la participación del anión superóxido mediante la reacción de Haber-Weiss **(1934)**. Ya que el OH[•] interactúa con la estructura más cercana y las células no cuentan con mecanismos enzimáticos que puedan combatirlo, éstas deben prevenir su formación mediante la eliminación de sus precursores, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno.



Reacción 3. Reacción de Haber-Weiss.

3.4.2.4. Oxígeno singulete (¹O₂)

Se origina cuando uno de los electrones libres del O₂ cambia de giro al captar energía, teniendo ahora giros opuestos, los electrones libres se aparean inmediatamente. Derivado de ello hay dos especies de oxígeno singulete: sigma (Σ) que es un radical libre muy inestable y delta (Δ) que no es un radical libre, pero tiene importancia en los sistemas biológicos al ser muy reactivo con los lípidos de membrana lo que produce radical peroxilo **(Konigsberg, 2008)**.

La formación de ¹O₂ se lleva a cabo por fagocitos activados **(Eberhardt, 2001)**, como resultado de la acción de la luz sobre el O₂ 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 **(Zhou et al., 2006)**.

3.5. Antioxidantes en el sistema biológico

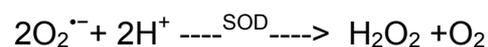
Las células poseen sistemas defensivos que les permiten controlar la concentración de las ERO. Estos sistemas son de dos tipos: sistemas antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.

Un agente antioxidante es aquella sustancia que a 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 estables, amplificando la resistencia de las macromoléculas sensibles al ataque de las ERO, facilitando la reparación del daño causado por las ERO o manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

3.5.1. Antioxidantes enzimáticos

Existen 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 (**Mates et al., 1999; Wells et al., 2005; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006; Rahman et al., 2006**). Dichas enzimas: superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y sistemas regeneradores de NADPH que previenen la formación de nuevos radicales libres.

1. Superóxido dismutasa (SOD).- Considerada la primera enzima de defensa antioxidante, ya que previene la formación del radical hidroxilo, catalizando la reacción de dismutación del anión superóxido (**Zanón, 2008**).



Reacción 4. Dismutación del anión superóxido

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

2. Catalasa (CAT).- Enzima tetramérica responsable de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (**Cheng et al., 1981**). Se encuentra en altas concentraciones en hígado, riñón y eritrocitos (**Aebi, 1982**).



Reacción 5. Reacción del H₂O₂ catalizada por CAT.

Esta enzima atraviesa las membranas celulares y una vez dentro de la célula reacciona con metales de transición para formar al radical hidroxilo (**Konigsberg, 2008**).

3. Glutación peroxidasa (GPx).- Enzima tetramérica que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos en presencia del glutatión (GSH) reducido. Se han identificado 4 isoformas: citosólica, plasmática, gastrointestinal y la de fosfolípidos (**Yu, 1994**).



Reacción 6. Reacción catalítica de la glutatión peroxidasa.

4. Glutación reductasa (GR).- 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 GRred-SG. Un rearrreglo de electrones que resulta en otro intercambio disulfuro libera al segundo GSH y a la GR oxidada.



Reacción 7. Reacción de la glutatión reductasa

3.5.2. Antioxidante no enzimático

Son compuestos no proteínicos que poseen la capacidad de interactuar de manera directa con las ERO. Pueden ser de origen endógeno, producidos por el organismo (glutati6n); o ex6geno, provenientes de la dieta (vitamina C, vitamina A, vitamina E y ajo).

1. Glutati6n (GSH).- Poderoso antioxidante que protege contra los efectos da1inos de metales pesados, tabaco y alcohol. Limita la actividad del an6n super6xido, radical hidroxilo y per6xido de hidr6geno. El GSH neutraliza a las ERO: radical hidroxilo y an6n super6xido al transferirles un 6tomo de hidr6geno (**Gibson et al., 1985; Burk, 1990; Vel6zquez et al., 2004**).

2. Vitamina C (6cido asc6rbico).- Compuesto hidrosoluble que se localiza en el citosol de las c6lulas y en fluidos extracelulares, es un inhibidor de la oxidaci6n de l6pidos y regenerador de la vitamina E. Interviene en los procesos de desintoxicaci6n, reaccionando contra las toxinas del tabaco. Actúa espec6ficamente con el an6n super6xido y el radical hidroxilo (**Vel6zquez et al., 2004**).

3. Vitamina A (β – caroteno).- Compuesto liposoluble, se encuentra en las membranas lip6dicas. Impide la lipoperoxidaci6n al reaccionar principalmente con el $O_2\bullet$ - (**Krinsky y Deneke, 1982**) y el radical hidroxilo generando al radical carotenilo ($Car\bullet$), el cual, puede ser reciclado al interactuar con el 6cido asc6rbico y/o α -tocoferol (**Halliwell y Gutteridge, 2001**).

4. Vitamina E (α -tocoferol).- Principal antioxidante soluble en l6pidos; previene la oxidaci6n de grasas. Es considerado el antioxidante m6s distribuido en los seres vivos. Aumenta su acci6n en presencia de zinc. Actúa espec6ficamente sobre los radicales de 6cido graso poli insaturado (**Vel6zquez et al., 2004**).

5. 6cido 6rico.- Producto final del metabolismo de las purinas en humanos, pero tambi6n se le conocen propiedades antioxidantes, se desconoce el proceso mediante el cual ejerce su acci6n protectora. Algunos reportes sugieren que el 6cido 6rico forma complejos con metales de transici6n tales como el hierro y el cobre cuando interactua con el ascorbato (**Sevanian et al., 1985; Davies et al., 1986**).

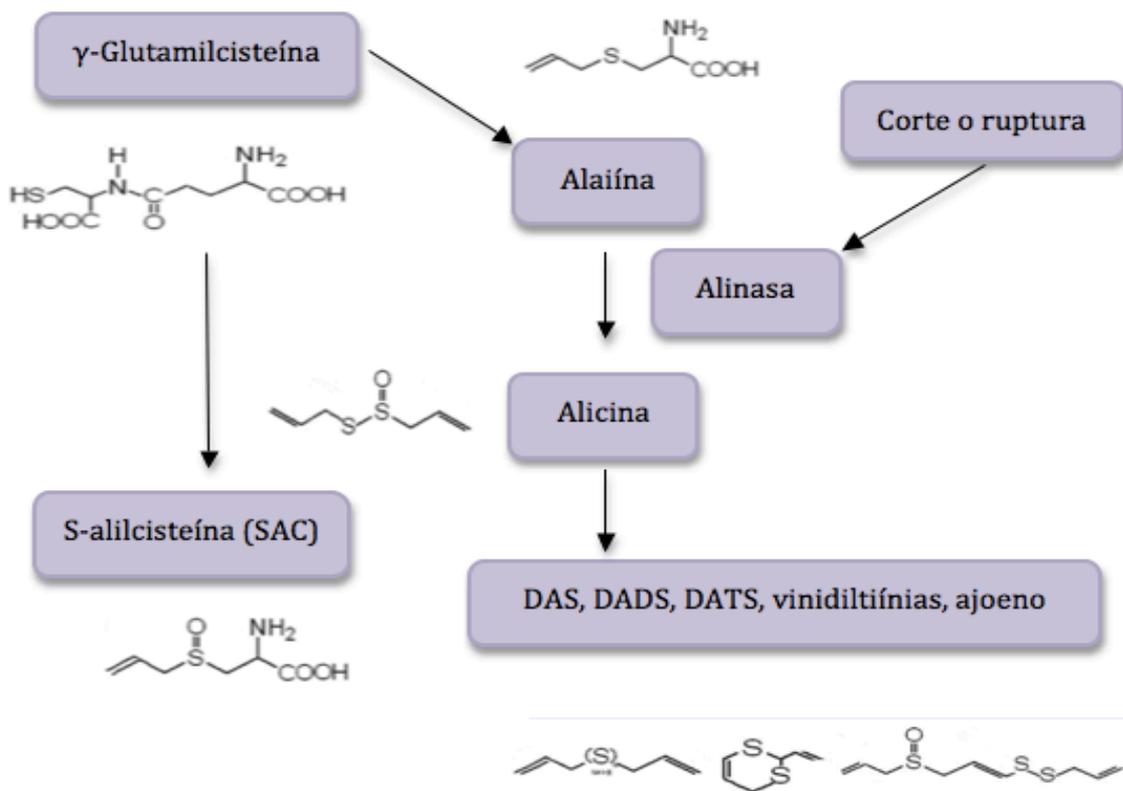
3.6. Ajo como antioxidante

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta perteneciente a la familia Liliaceae, originaria de Asia central, ha sido usada históricamente con propósitos culinarios y medicinales, particularmente para el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento (Ishikawa et al., 2009). En los últimos años numerosos estudios han destacado otras propiedades farmacológicas que posee esta planta, como son: antihipertensiva antimicrobiana, hipoglucémica, inmunosupresora, anticancerígena y antioxidante (Wongmekiata y Thamprasertb, 2005). Dichas propiedades, se atribuyen a los compuestos sulfurados que están presentes en el ajo, a los cuales también se les atribuye el olor característico del mismo (Berginc et al., 2009).



Esquema 2. (*Allium sativum* L.)

Los dientes de ajo intactos contienen una alta cantidad de γ -glutamilcisteínas que son hidrolizadas y oxidadas para formar la alina, compuesto mayoritario en los dientes de ajo. También se encuentran otros compuestos azufrados solubles en medio acuoso como la como la S-metil-L-cisteína, S-propenil-S-cisteína, S-glutación, g-glutamil-S-alil cisteína, y g-glutamil-S-alil-mercapto-L- cisteína. Al momento de cortarlo, machacarlo 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 ajoeno (esquema 3) (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). Los bulbos de la planta contienen 6mg/g de aliína, lo cual corresponde al 1.7% del peso seco del ajo y 2.8% de la proteína alinasa (López, 2007; Fujisawa et al., 2008). Además de estos compuestos, en la planta se encuentran sales minerales (selenio), azúcares, lípidos, aminoácidos esenciales, vitaminas, enzimas, flavonoides y otros compuestos fenólicos (López, 2007).



Esquema 3. Cambios químicos de los compuestos presentes en el ajo (Amagase *et al.*, 2001).

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 | |
|-----------------------------------|------------------------|
| | (mg/g producto) |
| S-alilcisteína sulfóxido (aliína) | 6.0–14.0 |
| γ-glutamilcisteínas | 5.0–15.0 |
| Compuestos derivados de la aliína | 3.5–8.0 |
| Extracto de Ajo Envejecido | |
| S-alilcisteína sulfóxido (aliína) | 0.2–0.4 |
| γ-glutamilcisteínas | 0.2–0.5 |
| γ-glutamil-S-alilcisteína | 0.1–0.4 |
| S-alil-cisteína | 0.5–0.7 |
| S-alil-mercaptocisteína | 0.1–0.2 |
| Compuestos derivados de la aliína | 0.1–0.2 |
| Polvo de Ajo | |
| -alilcisteína sulfóxido (aliína) | 10.0–17.0 |
| γ-glutamilcisteínas | 12.0–35.0 |
| Compuestos derivados de la aliína | 4.0–11.0 |
| Aceite de Ajo | |
| Destilación con vapor: | |
| Dialildisulfuro | 0.05-2.8 |
| Dialiltrisulfuro | 0.04-2.0 |
| Alilmetiltrisulfuro | 0.03-1.7 |
| Compuestos derivados de la aliína | 0.2-11 |
| Macerado: | |
| Vinilditiínas | 0.1-4.7 |
| Ajoeno | 0.02-1.1 |
| Dialiltrisulfuro | 0.02-0.45 |
| Compuestos derivados de la aliína | 0.4-6.0 |

3.6.1. Extracto de ajo envejecido (EAE)

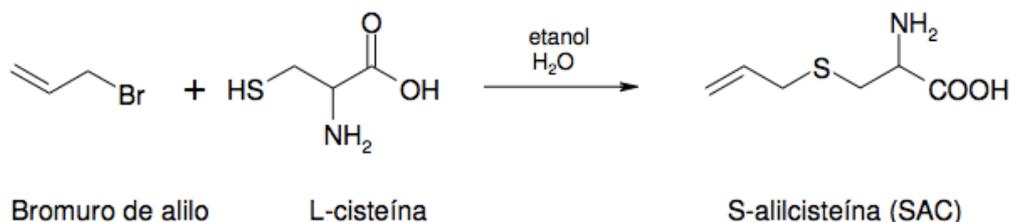
El extracto de ajo envejecido (EAE) se prepara con ajo crudo rebanado, macerado por 20 meses en etanol 15- 20% (p/v) a temperatura ambiente, proceso que tiene por objetivo eliminar la mayoría de las sustancias sulfuro que son solubles en aceite (DAS, DADS) y que son las que le otorgan las propiedades de sabor y olor al ajo crudo. Diversos experimentos han evidenciado la capacidad del EAE de ofrecer protección contra la oxidación inducida por varias enfermedades, incluso contra la nefrotoxicidad producida por la administración de algunos antibióticos, como la gentamicina (**Maldonado et al., 2003; Wongmekiata & Thampraserb, 2005**). Sus componentes más abundantes son: la alina, la γ -glutamyl-S-alilcisteína, la γ -glutamyl-L-cisteína, S- alil-cisteína (SAC) y la S-alil-mercaptocisteína (SAMC), pero también contiene compuestos insolubles (**Lawson, 1998**).

Diversos estudios ha demostrado la utilidad del EAE en diversas áreas de la salud (**Sumiyoshi, 1997**), se ha asociado con la mejora del perfil de colesterol, (**Steiner et al., 1996; Steiner y Lin, 1998;**), disminuye los niveles de triglicéridos (**Steiner et al., 1996**), estimula al sistema inmune (**Lamm & Riggs, 2001**), mitiga los efectos de los oxidantes (**Borek, 2001**), normaliza la presión arterial (**Steiner et al., 1996; Rahman, 2000**), mejora la circulación (**Moguchi et al., 2001; Ohnishi y Ohnishi, 2001**), inhibe la agregación plaquetaria (**Allison et al., 2006**), reduce el desarrollo de la aterosclerosis (**Efendy et al., 1997**), reduce el estrés psicológico (**Ushijima y Sumioka, 1997**) e inhibe el crecimiento y desarrollo de algunos tipos de cáncer (**Buiatti et al., 1989; You y Blot, 1988**)

3.6.2. S-alil-cisteína (SAC)

La SAC es uno de los compuesto organosulfurados hidrosolubles que se encuentra en muy pequeñas cantidades en el ajo intacto y se ha observado que este compuesto protege a las membranas celulares hepáticas contra la agresión de peróxidos lipídicos y protegen el endotelio vascular frente a peróxido de hidrógeno (**Amagase, 2006**). La SAC puede formarse en una preparación acuosa a través de la hidrólisis de la γ -glutamyl-S-alilcisteína, la cual existe en el ajo crudo como

precursor de SAC (**Kodera et al., 2002**), también puede ser sintetizada a partir de L-cisteína y bromuro de alilo (reacción 8) y purificada por recristalización con agua y etanol (**Nagae et al., 1994; Maldonado et al., 2003**).



Reacción 8: Reacción de síntesis y estructura química de la SAC.

La SAC se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal y se distribuye principalmente en plasma, hígado y riñón (**Yan y Zeng, 2005; Nagae et al., 1994**).

Se ha encontrado que la SAC puede reaccionar con el O₂^{*-}, H₂O₂, OH^{*} y ONOO⁻ (**Maldonado et al., 2003; Chun, 2006; Ide y Lau, 2001; Kim et al., 2006**). Tiene una gran actividad antioxidante (**Numagami et al., 1996**), un efecto hepato-protector (**Nakagawa et al., 1998; Kalayarasan et al., 2008**), reno-protector (**Segoviano-Murillo et al., 2008**), cardio-protector (**Chuah et al., 2007**), reduce el riesgo de necrosis en el hígado por acetaminofen (**Sumioka et al., 1998**) e induce la hepatogénesis (**Sundaresan y Subramanian 2008**). También reduce la adhesión e invasión de células de tumor mamario (**Gapter et al., 2008**).

4. Justificación

En la última década, la DM se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. El riesgo de padecerla es mayor en quienes consumen una alimentación hipercalórica, tienen una vida sedentaria y familiares con antecedentes con DM.

México se encuentra dentro de los diez países con mayor número de diabéticos y el número de personas que padecen diabetes se ha incrementado por lo que actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país **(ENSANUT, 2012)**.

Los trastornos metabólicos de la DM dan lugar a varias complicaciones, generalmente al cabo de muchos años. Entre ellas se encuentra la insuficiencia renal crónica, que por sí sola, constituye un gran problema.

Se ha reportado que la enfermedad renal es la primera causa de muerte en pacientes con DM. La ND está dentro de las cinco primeras causas de atención médica en hospitales. **(Loredo, 2006)**.

El tratamiento de la IR, diálisis o trasplante renal, requiere de grandes cantidades de recursos, por lo que es necesario encontrar métodos que permitan prevenir o retrasar la progresión del daño renal en la ND, con el fin de brindar diferentes alternativas del tratamiento de la IR antes de que desarrollen complicaciones tardías, las cuales provocan un deterioro en la calidad de vida e incluso la muerte, independientemente del gran costo económico **(Vázquez et al., 2005)**.

En los últimos años, se ha renovado el interés en las plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades, por lo que es importante poder conocer antioxidantes de origen natural, para ayudar a la defensa antioxidante del organismo a contrarrestar el daño oxidante y a disminuir algunas complicaciones de enfermedades como la DM.

En este trabajo se empleó la SAC, principal componente del extracto de ajo envejecido, con el fin de determinar su efecto protector. Lo anterior puede contribuir a diseñar nuevas estrategias encaminadas a disminuir la IRA inducida por DM.

5. Hipótesis

Los individuos con DM presentan niveles altos de glucosa, colesterol, triglicéridos y enfermedades asociadas como la nefropatía. Se ha caracterizado la presencia de estrés oxidante en los individuos con esta enfermedad y la utilidad de algunos antioxidantes en su tratamiento. Por tanto es posible que el antioxidante SAC disminuya los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y la nefropatía asociados con la DM.

6. Objetivo general

Evaluar si la SAC es capaz de disminuir la IR y los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos ocasionados por la DM.

7. Objetivos particulares

- Reproducir un modelo de DM en rata, inducida por STZ y una dieta alta en lípidos y carbohidratos.
- Medir la función renal.
- Evaluar el efecto protector la SAC en la IRA ocasionada por la DM.
- Medir parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos).
- Determinar el daño renal.
- Evaluar el estrés oxidante en riñón.

8. Materiales y Métodos

8.1. Reactivos

Para las determinaciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, creatinina en suero, depuración de creatinina, nitrógeno de urea en sangre y lactato deshidrogenasa se emplearon kits comerciales SPINREACT de LAB CENTER DE MÉXICO. El nitroazul de tetrazolio, el NADPH, la glutatión reductasa, el glutatión reducido, la albúmina sérica bovina, el reactivo de Folin, el carbonato sódico, la xantina y la xantina oxidasa fueron de SIGMA CHEMICAL. El fosfato de potasio monobásico, el fosfato de sodio dibásico, tartrato sódico potásico, el peróxido de hidrógeno, el sulfato de amonio y la sal disódica del ácido etileno diamino tetraacético fueron de JT BAKER. El sulfato cúprico y el carbonato de sodio fueron de MALLINCKRODT. El cloruro de cobre fue de RIEDEL-DE HAËN.

8.2. Antioxidante

La SAC fue proporcionada por la Dra. Maldonado (**Maldonado *et al.*, 2003**). La solución para administrar fue preparada el mismo día de uso, pesando la cantidad requerida de SAC en cada protocolo y disolviéndola en medio de cultivo isotónico. La dosis administrada fue de 100 mg/kg. Se administró diariamente hasta el término del protocolo.

8.3. Fármaco (STZ)

La solución de STZ, se preparó el mismo día de uso. Se pesó la cantidad requerida y se disolvió en amortiguador de citratos pH 4. La dosis administrada de STZ fue de 60 mg/kg.

8.4. Sujetos experimentales

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar entre 240-290 g de peso, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se trataron siguiendo las consideraciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-

ZOO-1999. Las ratas se mantuvieron en cajas colectivas con libre acceso a agua y alimento, bajo condiciones estándar de temperatura a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, con ciclos artificiales de luz-oscuridad de 12 h (6:00 a.m. -18:00 p.m.). Se asignaron de forma aleatoria a cada uno de los grupos y todos los procedimientos se realizaron acorde con los principios éticos para el uso de animales.

8.5. Diseño Experimental

Grupos.- La población experimental se dividió en 3 grupos diferentes asignados aleatoriamente (**tabla 2**). En protocolos previos a la realización de esta tesis se incluyeron los grupos: 15% grasa + 15% azúcar y STZ, y debido al costo del tratamiento y la cantidad de animales, no se incluyeron nuevamente. Los animales del grupo: 15% grasa + 15% azúcar, presentaron valores normales en todas las mediciones realizadas. Los animales del grupo: STZ presenta daño metabólico pero no daño renal.

Tabla 2. Grupos experimentales

| Grupos | Dieta | STZ | Antioxidante |
|---------------|------------------------|----------|-----------------|
| 1. CT | Normal | ----- | ----- |
| 2. STZ+GA | 15% grasa + 15% azúcar | 60 mg/kg | ----- |
| 3. STZ+GA+SAC | 15% grasa + 15% azúcar | 60 mg/kg | SAC (100 mg/kg) |

La diabetes fue inducida mediante la administración de STZ por vía intraperitoneal (i.p.) con la dosis respectiva para cada sujeto. Se utilizó alimento estándar para roedores Rodent Chow®, para preparar la dieta alta en grasa, se le adicionó manteca de cerdo al 15% p/p, el agua azucarada se obtuvo mezclando azúcar de mesa (sacarosa comercial) 15g/L.

Cada 7 días los sujetos experimentales se colocaron en cajas metabólicas (NALGE COMPANY) por 24 h, con el fin de obtener su orina y se tomaron muestras de sangre de la cola, aproximadamente 500 μL . Todas las ratas fueron pesadas antes, durante y al final del protocolo, cuya duración fue de 6 semanas. Al término del mismo, se sacrificó a los sujetos experimentales por decapitación.

8.6. Muestras

8.6.1. Orina

Se recolectó la orina por 24 h. La cual se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos 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.

8.6.2. Suero

El suero se obtuvo de la sangre que se recolectó de las venas de cola de las ratas, 500 µL aproximadamente. La sangre de cada rata se recolectó en diferentes tubos, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, del suero obtenido se transfirió una alícuota en micro tubos y se mantuvieron en congelación para su posterior uso.

8.6.3. Riñón

Se obtuvieron los riñones de cada una de las ratas, previo sacrificio por decapitación (según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999), los riñones se cortaron transversalmente y se colocaron en papel aluminio para guardarlos a -20°C para su uso posterior.

8.6.4. Homogenizado para la determinación de actividad enzimática.

El homogenizado de riñón se preparó en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, tritón 1%, empleando el homogenizador durante 20 s. Se utilizó una dilución de tejido 1:4 (p/v). Los homogenizados se centrifugaron en una microcentrífuga Beckman a 15000 rpm durante 1 h a 4°C.

8.6.5. Cortes histológicos.

Los cortes transversales de riñón se fijaron cada uno en 1 mL de formol al 10% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) por 24 h y posteriormente se deshidrataron con 3 lavados con etanol absoluto de 1 h cada uno. Posteriormente,

los cortes se trataron con 3 lavados de xilol y luego con 3 lavados de parafina fundida. Una vez fría la parafina, el bloque se desmoldó y se procedió a realizar cortes de 4 μm con un microtomo de rotación (Leica RM 2145). Previamente se prepararon portaobjetos esmerilados con una solución de γ -metacrilixipropiltrimetoxiisilano al 5% en acetona. Los portaobjetos se sumergieron 5 min en dicha solución y se dejaron secar por 12 h. Los cortes se colocaron en los portaobjetos silanizados y se incubaron por 15 min a 60°C. Al finalizar este tiempo de incubación las muestras se realizó una tinción de hematoxilina y eosina (H&E). Ver sección 8.8.3.1

8.7. Evaluación de DM

8.7.1. Parámetros Bioquímicos

8.7.1.1. Glucosa

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucosa en células, provoca la oxidación de la misma o el almacenamiento en forma de glucógeno, promoviendo su síntesis e inhibiendo su degradación.

La DM es una enfermedad que se manifiesta por sed, poliuria, polifagia, visión borrosa, pérdida de peso y principalmente hiperglucémia, la cual es causada por un déficit de insulina.

La determinación de glucosa consumida en suero se realizó con el método de Trinder (1969), en el cual la enzima glucooxidasa cataliza la oxidación de glucosa a gluconato y peróxido de hidrógeno. La concentración de glucosa es proporcional al H_2O_2 generado, éste puede medirse acoplado su aparición a un indicador de peroxidasa. El producto formado absorbe a 505 nm y su absorbencia es directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

Antes de leer las muestras, se ajustó la lectura a cero con un blanco de agua, posteriormente se leyó el estándar de glucosa de 100 mg/dL. En una celda se adicionaron 4 μL del suero y 400 μL de la mezcla de reacción (TRIS, pH 7.4, 92 mM + fenol 0.3 mM + glucosa oxidasa 15000 U/L + peroxidasa 1000 U/L + 4-

aminofenazona 2.6mM), se leyó en el espectrofotómetro. La cantidad de glucosa presente en las muestras se obtuvo calculando la absorbencia de la muestra entre la absorbencia del estándar por la concentración del estándar. Se calcularon los mg de glucosa/dL.

8.7.1.2. Colesterol.

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas.

Para la determinación de colesterol en suero se empleó un método colorimétrico-cinético, el cual se basa en la reacción de la colesterol esterasa, la cual hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos, en una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa se forma H_2O_2 y colesteroína. El H_2O_2 se valora por la reacción Trinder (1969), mediante un cromógeno, fenol y 4- Aminofenazona, en presencia de peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra. El producto formado absorbe a 505 nm.

Antes de leer las muestras se ajustó la lectura a cero con un blanco de agua, posteriormente se leyó el estándar de colesterol de 100 mg/dL. En una celda se adicionaron 4 μ L del suero y 400 μ L de la mezcla de reacción (PIPES, pH 6.9, 90 mM + fenol 26 mM + colesterol esterasa 1000 U/L + colesterol oxidasa 300 U/L + peroxidasa 650 U/L + 4-aminofenazona 0.4 mM), se leyó en el espectrofotómetro. La cantidad de colesterol presente en las muestras se obtuvo calculando la absorbencia de la muestra entre la absorbencia del estándar por la concentración del estándar. Se calcularon los mg de colesterol/dL.

8.7.1.3. Triglicéridos

Los triglicéridos son grasas cuya degradación suministra energía a la célula. Al igual que el colesterol, los triglicéridos son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre.

La presencia de triglicéridos en el suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Trinder (1969), basado en la generación de un complejo rojizo el cual se basa en que los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual, mediante glicerol cinasa y glicerol-P-oxidasa, libera el H₂O₂. El producto formado absorbe a 505 nm y su absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra ensayada.

En una celda se adicionaron 4 µL del suero y 400 µL de la mezcla de reacción (GOOD, pH 7.5, 50 mM + p-Clorofenol 2 mM + lipoproteína lipasa 150000 U/L + glicerol quinasa 500 U/L + glicerol-3-oxidasa 3500 U/L + 4-aminofenazona 0.1 mM +ATP 0.1 mM + peroxidasa 440 U/L). Antes de realizar las lecturas de la muestras el espectrofotómetro se ajustó a cero frente a agua destilada. Después se leyó el patrón de trigliceridos de 200 mg/dL. La cantidad de triglicéridos presentes en las muestras se determinó calculando la absorbacia de la muestra entre la absorbancia del patrón y multiplicando por la concentración del mismo, con lo cual obtenemos la cantidad de triglicéridos (mg/dL) de cada muestra.

8.8. Evaluación de la IRA

8.8.1. Función tubular

8.8.1.1. Cuantificación de proteínas en orina

Un aumento en la excreción urinaria de proteínas puede ser indicativo de daño renal tubular y glomerular (**Pedraza-Chaverri et al., 1995**).

Se empleó el método colorimétrico Lowry (**1951**), el cual se basa en la formación de un complejo coloreado con las proteínas y la medición de la intensidad de color, a 580 nm, la cual es proporcional a la concentración de proteínas. Se tomaron 5 µL de las muestras de orina y se diluyeron con 95 µL de

agua, para tener un volumen final de 100 μL , después se le agregó 500 μL de solución C (soluciones A (Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N) y B (CuSO_4 0.5% en tartrato de sodio y potasio 1%), 50:1). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 min; posteriormente se les añadió 100 μL de la solución D (Folin + H_2O , 1:1) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) en un intervalo de 0.005 a 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se calcularon los mg de proteína/24 h.

8.8.2. Función glomerular

8.8.2.1. Creatinina en suero

La creatinina es producto del metabolismo de la fosfocreatina, la 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 el suero se determinó con un método colorimétrico-cinético mediante la reacción de Jaffé, basado en la generación de un complejo rojizo 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.

Antes de leer las muestras se ajustó la lectura a cero con un blanco de agua, posteriormente se leyó el estándar de creatinina de 2 mg/dL a los 0, 30, 60 y 90 seg. En una celda se adicionaron 40 μL del suero y 400 μL de la mezcla de reacción (ácido pícrico 17.5 mM e hidróxido de sodio 0.29 M, 1:1 v/v). Se leyó en el espectrofotómetro 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 la muestra (la lectura de 90 s menos la de 30 s) entre la

absorbencia del estándar por la concentración del estándar. Se calcularon los mg de creatinina/dL.

8.8.2.2. Depuración de creatinina (DC)

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-Chaverri et al., 1999**).

Para esta medición se cuantificó la concentración de creatinina en orina y suero y se calculó la depuración de la creatinina usando la siguiente fórmula:

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

Nota: 1440 son los min que hay en 24 h.

8.8.2.3. Nitrógeno de la urea en el suero sanguíneo (BUN)

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

Para la determinación de BUN se empleó el método de UV, el cual se basa en una reacción acoplada en la que el α -cetoglutarato, por acción de la glutamato deshidrogenasa pasa a L-glutamato, la cual emplea como cofactor al NADH presente en el medio y al amonio producido por la ureasa. La disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra ensayada. Las muestras se leen espectrofotométricamente a 340 nm.

En una celda se adicionaron 4 μ L del suero y 400 μ L de la mezcla de reacción (Tampón: TRIS, pH 7.8, 80 mM + α -cetoglutarato 6 mM + ureasa 75000

U/L; Enzimas: GLDH 60000 U/L + NADH 0.32 mM; 4:1). Se hicieron lecturas a los 0, 30, 60 y 90 s. Antes de realizar las lecturas de la muestra el espectrofotómetro se ajustó a cero con agua destilada. Después se leyó el patrón de urea de 50 mg/dL. La cantidad de BUN presente en las muestras se determinó calculando el cociente de las diferencias de densidad óptica (D.O.) de las lecturas de 30 y 90 s, entre las del patrón y multiplicando por la concentración del mismo, con lo cual obtenemos la cantidad de urea (mg/dL) de cada muestra. La cantidad BUN se calcula dividiendo la cantidad de urea entre 2.14, factor que indica el número de átomos de nitrógeno presentes en la molécula de urea. Se calcularon los mg de BUN/dL.

8.8.3. Estructura renal

8.8.3.1. Tinción de hematoxilina y eosina (H&E)

Los cortes histológicos se desparafinaron con 3 lavados de 5 min con xilol y se rehidrataron con 3 lavados de 5 min con alcohol a concentraciones decrecientes hasta llegar a agua. Se tiñeron los tejidos con hematoxilina durante 5 min, se lavaron con agua y con una solución de HCl 1% en etanol al 70%. Luego se viró la hematoxilina con LiCO_3 al 0.1% y se tiñeron con eosina durante 15 s y se realizaron lavados breves de etanol absoluto. Finalmente, los cortes ya teñidos se deshidrataron pasándolos por soluciones de etanol y xilol; se montaron para su observación con una resina soluble en xilol y un cubreobjetos. Esta tinción se realiza para observar las estructuras del tejido, la hematoxilina tiñe de morado los núcleos y la eosina tiñe el citoplasma y membranas de rosa.

8.8.3.2. Análisis histológico

Los cortes teñidos con H&E se analizaron con un microscopio de luz (Leica) con un lente de 40X. El daño se identificó por la presencia de signos de necrosis como la inflamación, vacuolas y detritus.

8.9. Evaluación del estrés oxidante

8.9.1. Evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón

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

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

8.9.1.2. 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 12.5 μ L del homogenizado diluido 1:30 en amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.0, se mezcló con 362.5 μ 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 s, el cual es el lapso en que la descomposición del H₂O₂ 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 fórmula: $K = (1/t) (2.3 \cdot \log A_1/[A_2])$, donde $t = t_2 - t_1$, A₁ y A₂ son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t₂ y t₁.

8.9.1.3. 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 homogenizado 1:10 con amortiguador de fosfatos y 50 μ L de esta dilución se mezclaron con 400 μ L de la siguiente solución: fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0, ácido etilendiaminotetraacético (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 mezcla de reacción y agua destilada, las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente; posteriormente se adicionó todo el volumen a la celda con 50 μ 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 μ mol de NADPH en un minuto.

8.10. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó empleando el programa Prism versión 5.0a, (GraphPad, San Diego, CA, E.U) mediante prueba de ANADEVIA o en como en sus siglas en ingles ANOVA. Los resultados se expresaron utilizando el valor de la media \pm EEM, seguido del análisis de comparación múltiple de Bonferroni. Un valor de $P < 0.05$ vs CT o GA+STZ se consideró estadísticamente significativo.

9. Resultados y discusión

9.1. Evaluación del efecto protector de los antioxidantes en el daño renal inducido por la DM

9.1.1. Peso

En la Figura 1, que corresponde al peso de los sujetos experimentales antes, durante y al final del protocolo, se observó los sujetos del grupo control (CT) aumentaron de peso a lo largo del protocolo (ANOVA 2 vías: Tiempo $P < 0.0001$) y que los grupos tratados con STZ el peso disminuyó conforme transcurrió el tiempo a partir de la administración de la STZ (ANOVA 2 vías: Tiempo $P < 0.0001$). Al final del protocolo pudimos observar diferencias entre los grupos CT y STZ+GA (ANOVA 2 vías: Tratamiento $P < 0.0001$). El grupo de STZ+GA+SAC presenta mucha dispersión de los datos.

El aumento de peso de los sujetos del grupo CT, es normal para individuos de su edad y peso (**Maldonado et al., 2003**). La disminución del peso de los sujetos tratados con STZ a partir de la administración de dicho fármaco se debe principalmente a la destrucción de las células β pancreáticas, dando como resultado la deficiencia de insulina y por tanto síntomas característicos de la DM, entre ellos la disminución de la masa corporal (**Srinivasan et al., 2005**). La dispersión de los datos del grupo STZ+GA+SAC se debe a que hubo individuos que aumentaron de peso como los del grupo CT y otros que no, como los del grupo STZ+GA. Esto sugiere una protección parcial de la SAC ya que en algunos individuos se evitó la pérdida de peso.

Estos datos era esperados ya que la reducción del peso corporal en los sujetos a los que se le administró la STZ concuerda con datos encontrados en la literatura (**Karnieli et al., 1981, Srinivasan et al., 2005, Wang et al., 2011**).

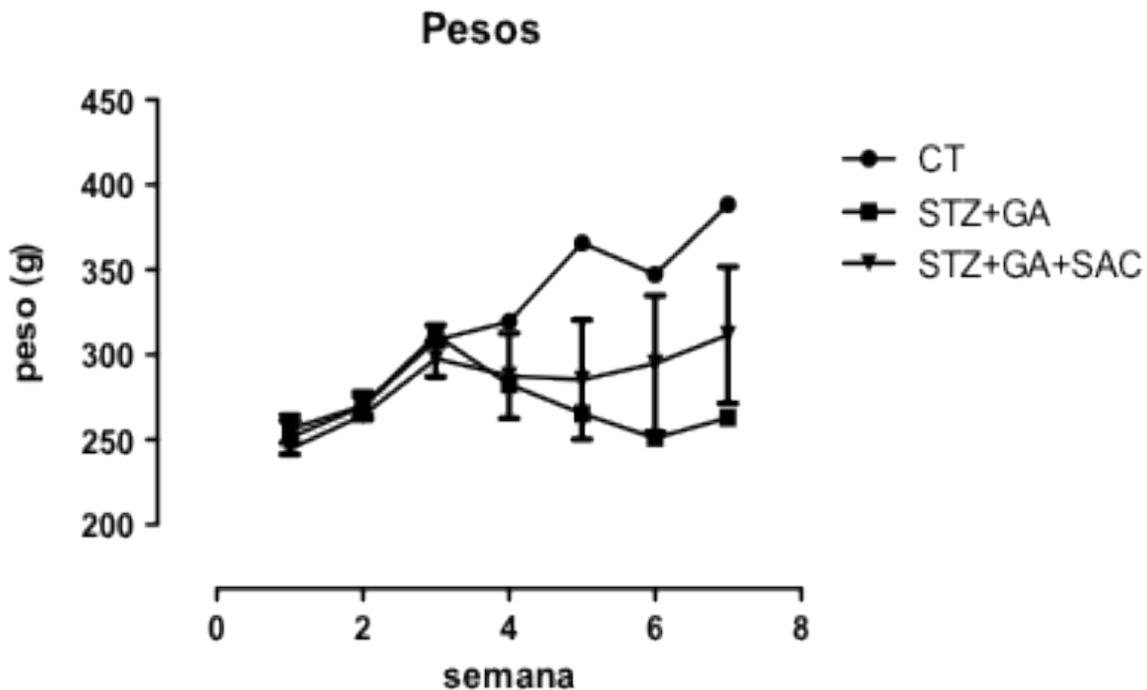


Figura 1: Evaluación de la diabetes mellitus. Peso corporal de las ratas a lo largo del protocolo. CT: grupo control; STZ+GA: grupo tratado con STZ y dieta hipercalórica (15% de grasa y 15% de azúcar); STZ+GA+SAC: grupo tratado con STZ, dieta hipercalórica y SAC. Promedio \pm EEM. n = 2-4. ANOVA de 2 vías: Tratamiento $P < 0.0001$, Tiempo $P < 0.0001$.

9.1.2. Parámetros Bioquímicos

Para evaluar el daño producido por la administración de la STZ y una dieta alta en carbohidratos (DM) se midieron marcadores bioquímicos: determinaciones séricas de glucosa, colesterol y triglicéridos.

Las mediciones de los parámetros bioquímicos se realizaron cada semana una vez administrada la STZ para determinar si hubo daño producido por dicha sustancia y por la dieta alta en carbohidratos (inducción de DM) y si el antioxidante SAC es capaz de disminuir o controlar los niveles.

En la Figura 2a se observó que los niveles de glucosa del grupo CT fueron normales (**Saravanan et al., 2010**), en el grupo de STZ+GA se observaron niveles de glucosa a más del doble a los del grupo control (hiperglucemia) (ANOVA 2 vías: Tratamiento $P < 0.0001$) y los niveles ambos grupos se mantuvieron constantes

durante todo el protocolo. En el grupo de STZ+GA+SAC se observaron niveles de glucosa semejantes al grupo CT en los semanas 4 y 5; y aumenta en la semana 6 (ANOVA 2 vías: Tiempo $P=0.0378$). Además presentó una diferencia significativa con respecto al grupo STZ+GA en la semana 6 ($P<0.05$).

Se observa que los niveles de colesterol (Figura 2b) del grupo CT fueron normales (**Saravanan y Ponmurugan, 2012**) y se mantuvieron a largo del estudio (ANOVA 2 vías: Tiempo, $P=0.2208$). El grupo de STZ+GA mantuvo elevado los niveles de colesterol, a más del doble de los valores normales (hipercolesterolemia) (ANOVA 2 vías: Tratamiento, $P<0.0001$). El grupo STZ+GA+SAC mantuvo valores de colesterol semejantes al grupo CT. En la semana 4 se observó la mayor diferencia entre los grupos CT y STZ+GA+SAC ($P<0.05$).

Durante todo el protocolo, los niveles de triglicéridos (Figura 2c), se mantuvieron constantes en los grupos CT y STZ+GA+SAC (ANOVA 2 vías: Tiempo, $P=0.1238$), contrario al grupo STZ+GA, en donde los niveles de triglicéridos fueron mayores (hipertriglicemia) (ANOVA 2 vías: Tratamiento, $P<0.0001$). El grupo STZ+GA presentó un pico en los niveles de triglicéridos en la semana 5 y mostró una diferencia significativa ($P<0.05$) con respecto al grupo CT. Tanto el grupo CT como el grupo STZ+GA+SAC se observaron una diferencia significativa ($P<0.05$) con respecto al grupo STZ+GA en la semana 6.

Estos tres parámetros nos indican que se logró establecer un modelo de DM con la administración de STZ y una dieta alta en carbohidratos y lípidos. Se observaron las características típicas de dicho padecimiento: hiperglucemia, hipertriglicemia e hipercolesterolemia en presencia de una dieta hipercalórica. El aumento de los niveles de glucosa en el grupo STZ+GA se produjo por un deterioro de las células β pancreáticas (**Srinivasan et al., 2005; Okamoto et al., 2008**). La administración de la SAC ayuda a normalizar los niveles de glucosa en sangre, y se ha sugerido que se debe a que la SAC tiene un efecto semejante a la insulina en tejidos periféricos, ya sea por la captación de glucosa o inhibiendo la gluconeogénesis hepática (**Saravanan y Ponmurugan, 2012**).

La hiperlipidemia es una complicación conocida de la diabetes mellitus y coexiste con la hiperglucemia y se caracteriza por el aumento de los niveles de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. En este trabajo se observó un nivel alto de

triglicéridos y colesterol en el grupo STZ+GA, debido a la administración de la STZ en presencia de la dieta alta en grasas y azúcar (**Srinivasan et al., 2005**). El tratamiento con SAC normaliza estos parámetros y puede ser debido a un aumento en la secreción de insulina que finalmente condujo a una disminución en la síntesis de colesterol y ácidos grasos (**Saravanan y Ponmurugan, 2012**).

Observamos que la administración de SAC genera un efecto benéfico en el control de los parámetros (glucosa, colesterol y triglicéridos) ya que mostró valores semejantes a los del grupo CT.

Debido a que en las últimas décadas, la población Mexicana ha modificado sus patrones de alimentación caracterizada por un consumo creciente de alimentos ricos en colesterol, grasas saturadas, azúcares y sodio, entre otros nutrientes, asociado a un aumento en las enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición, como la diabetes y la obesidad entre otros (**Fausto Guerra et al., 2006**). Considerando esto se puede tomar este modelo como estudio de la situación actual del país.

Las características metabólicas observadas en este modelo corresponden a diabetes tipo 2, como lo han reportado otros grupos de investigación (**Srinivasan et al., 2005**). Sin embargo, es deseable comprobar esto en las condiciones de nuestro estudio. Es decir falta evaluar si las ratas de nuestro modelo presentan resistencia a la insulina y existe completa destrucción de las células beta.

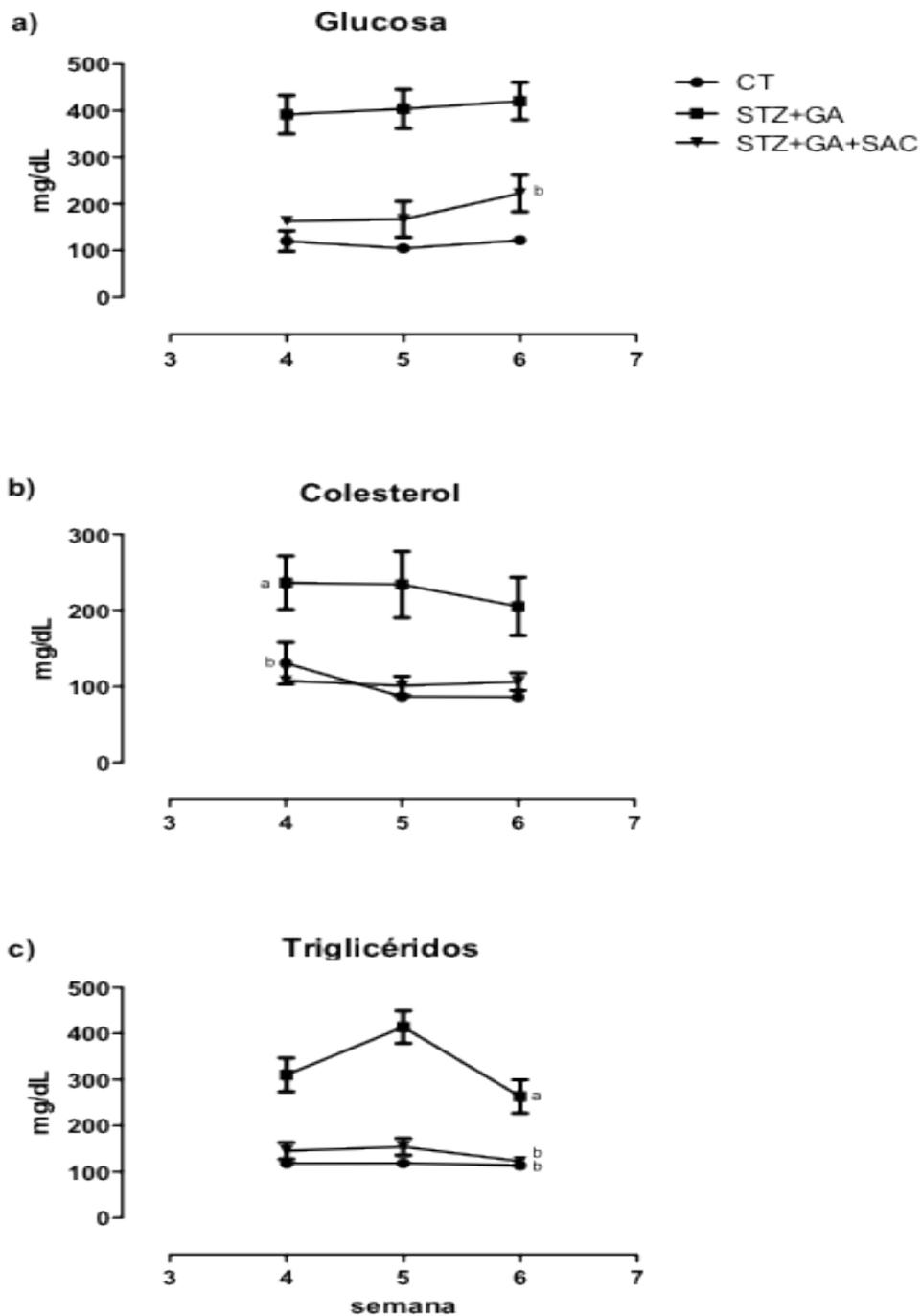


Figura 2. Evaluación de la diabetes mellitus por medio de parámetros bioquímicos: glucosa, colesterol y triglicéridos. CT: grupo control; STZ+GA: grupo tratado con STZ y dieta hipercalórica (15% de grasa y 15% de azúcar); STZ+GA+SAC: grupo tratado con STZ, dieta hipercalórica y SAC. Promedio \pm EEM. n = 2-4. a: $P < 0.05$ vs CT y b: $P < 0.05$ vs STZ+GA. **a) Glucosa:** Tratamiento $P < 0.001$, Tiempo $P = 0.0378$; **b) Colesterol:** Tratamiento $P < 0.0001$, Tiempo $P = 0.2208$ y **c) Triglicéridos:** Tratamiento $P < 0.001$, Tiempo $P = 0.0672$.

9.1.3. Marcador de daño tubular

En relación a los marcadores de daño tubular se midió la excreción urinaria de proteínas (Figura 3), se observó que los niveles de PT del grupo CT fueron normales (**Maldonado et al., 2003**) y constantes a lo largo del estudio (ANOVA 2 vías: Tiempo $P=0.0841$). En el grupo STZ+GA los niveles de PT aumentaron casi el doble con respecto al grupo CT (ANOVA 2 vías: Tratamiento $P=0.0372$). Los valores PT del grupo STZ+GA+SAC estuvieron entre el grupo CT y el grupo STZ+GA en los días 4 y 5; sin embargo, estos valores no fueron significativamente a ninguno.

Este parámetro es un indicativo importante en la clínica para el diagnóstico de nefropatía diabética, por lo que se esperaba que los niveles de PT en el grupo tratado con la STZ aumentaran, porque indica que el túbulo fue dañado y los restos celulares son eliminados por la orina. Sin embargo en este modelo no se observó muy elevado. Por lo que creemos que el pequeño aumento de las proteínas es debido al mal funcionamiento del glomérulo. Por otro lado, los individuos del grupo STZ+GA+SAC presentaron una respuesta variable, es decir unos se parecen al grupo CT y otros al grupo STZ+GA.

No hay estudios que reporten una evaluación de los parámetros de proteínas en orina utilizando la SAC como terapia en DM.

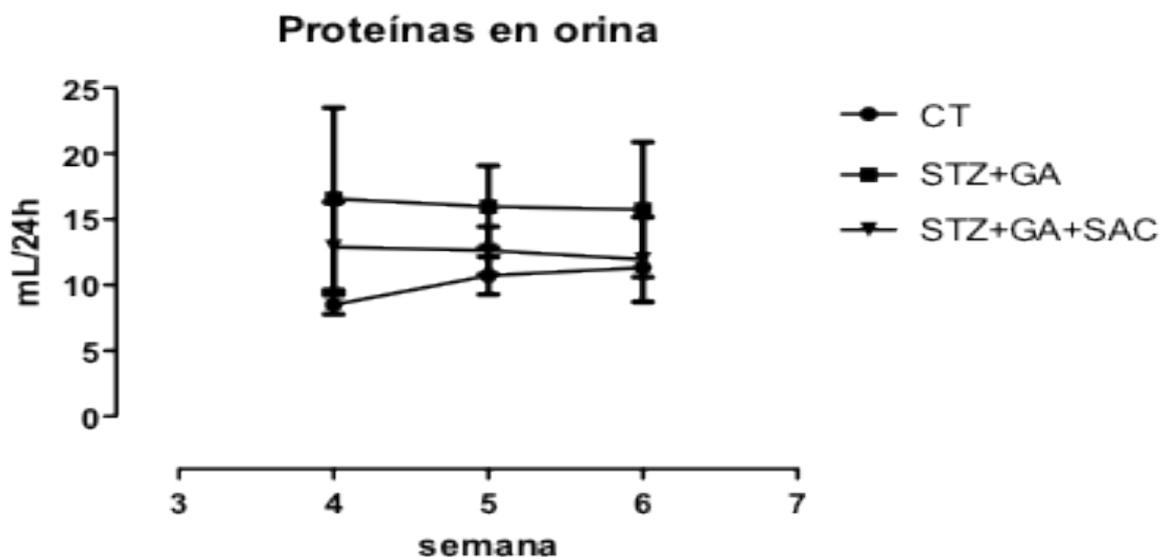


Figura 3. Evaluación del daño renal por medio de un marcador de daño tubular. Cuantificación de proteínas en orina. CT: grupo control; STZ+GA: grupo tratado con STZ y dieta hipercalórica (15% de grasa y 15% de azúcar); STZ+GA+SAC: grupo tratado con STZ, dieta hipercalórica y SAC. Promedio \pm EEM. n = 2-4. a: $P < 0.05$ vs CT y b: $P < 0.05$ vs STZ+GA. Tratamiento $P = 0.0372$, Tiempo $P = 0.0841$.

9.1.4. Función glomerular

Se evaluó el daño renal a nivel glomerular, mediante la medición CS, DC y BUN (Figura 4).

En la Figura 4a se observa que los niveles de CS del grupo control fueron normales y constantes durante el estudio. En el grupo STZ+GA los niveles de CS aumentaron considerablemente, a más del doble en comparación con los niveles de las ratas del grupo CT (ANOVA 2 vías: Tratamiento, $P < 0.0001$); además se observó en este grupo que los niveles de CS disminuyen a lo largo del estudio (ANOVA 2 vías: Tiempo $P = 0.0486$) y existe diferencia en la semana 5 ($P < 0.05$) entre los grupos CT y STZ+GA. Las ratas del grupo STZ+GA+SAC presentaron niveles de CS semejantes al grupo CT.

Estos resultados hace evidente una prevención total del daño con la administración de la SAC, ya que los valores de CS en el grupo STZ+GA+SAC se mantuvieron al mismo nivel que las del grupo CT.

Respecto a Figura 4b los valores DC de los sujetos del grupo CT son normales y se mantienen a lo largo del estudio (**Maldonado et al., 2003**) (ANOVA 2 vías: Tiempo $P=0.0210$). Los niveles de DC del grupo STZ+GA disminuyeron a más del doble en comparación al CT (ANOVA 2 vías: Tratamiento, $P=0.0003$). La DC en el grupo STZ+GA+SAC fue similar a la del grupo CT y ambos grupos muestran una diferencia significativa en la semana 4 con respecto al grupo STZ+GA ($P<0.05$).

Se hizo evidente el daño renal, ya que los niveles de DC del grupo STZ+GA disminuyeron en comparación al CT, lo que concuerda con lo obtenido en la gráfica de CS, ya que a menores niveles de depuración, mayores niveles de creatinina en suero. Por tanto el daño se previno totalmente en el grupo tratado con la SAC.

En cuanto a la Figura 4c los niveles de BUN del grupo CT fueron normales (**Maldonado et al., 2003**) y son constantes a lo largo de todo el estudio. En contraste a el grupo STZ+GA donde los niveles de BUN son mayores (ANOVA 2 vías: Tratamiento $P<0.0001$), van aumentando a lo largo del estudio (ANOVA de 2 vías: Tiempo $P=0.0430$) y son diferentes significativamente respecto al grupo CT ($P<0.05$) en la semana 5. En el grupo STZ+GA+SAC los valores de BUN son semejantes a los del grupo CT.

Al igual que en los casos anteriores, el aumento de BUN se previno totalmente.

Considerando los datos mostrados en las gráficas de la Figura 4, es evidente el daño renal provocado por la STZ. Observamos que los parámetros de las ratas control tuvieron valores normales (**Barrera et al., 2003; Maldonado et al., 2003**).

El incremento en los niveles de CS y de BUN en plasma sanguíneo, son parámetros empleados como marcadores de daño a nivel de glomérulo (**Schor et al., 1982; Pedraza-Chaverrí et al., 1999**) y la depuración de creatinina es una manera de medir la velocidad de filtración glomerular y puede estar asociada con la producción de ERO, ya que estas pueden inducir disminución en la velocidad de filtración glomerular (**Duque et al., 1992**); siendo esta una de las asociaciones del estrés oxidante y el daño renal. Además nos indica que los antioxidantes son posibles moléculas para tratar el daño producido por estrés oxidante.

Los resultados fueron los esperados y nos indican que el antioxidante (SAC) es capaz de prevenir los cambios en CS, BUN y DC en las ratas con nefropatía diabética.

Aunque se ha utilizado la SAC en este modelo, en la literatura no se reportan parámetros de función renal (creatinina, BUN, proteínas en orina), por lo que no pudimos comparar los resultados obtenidos.

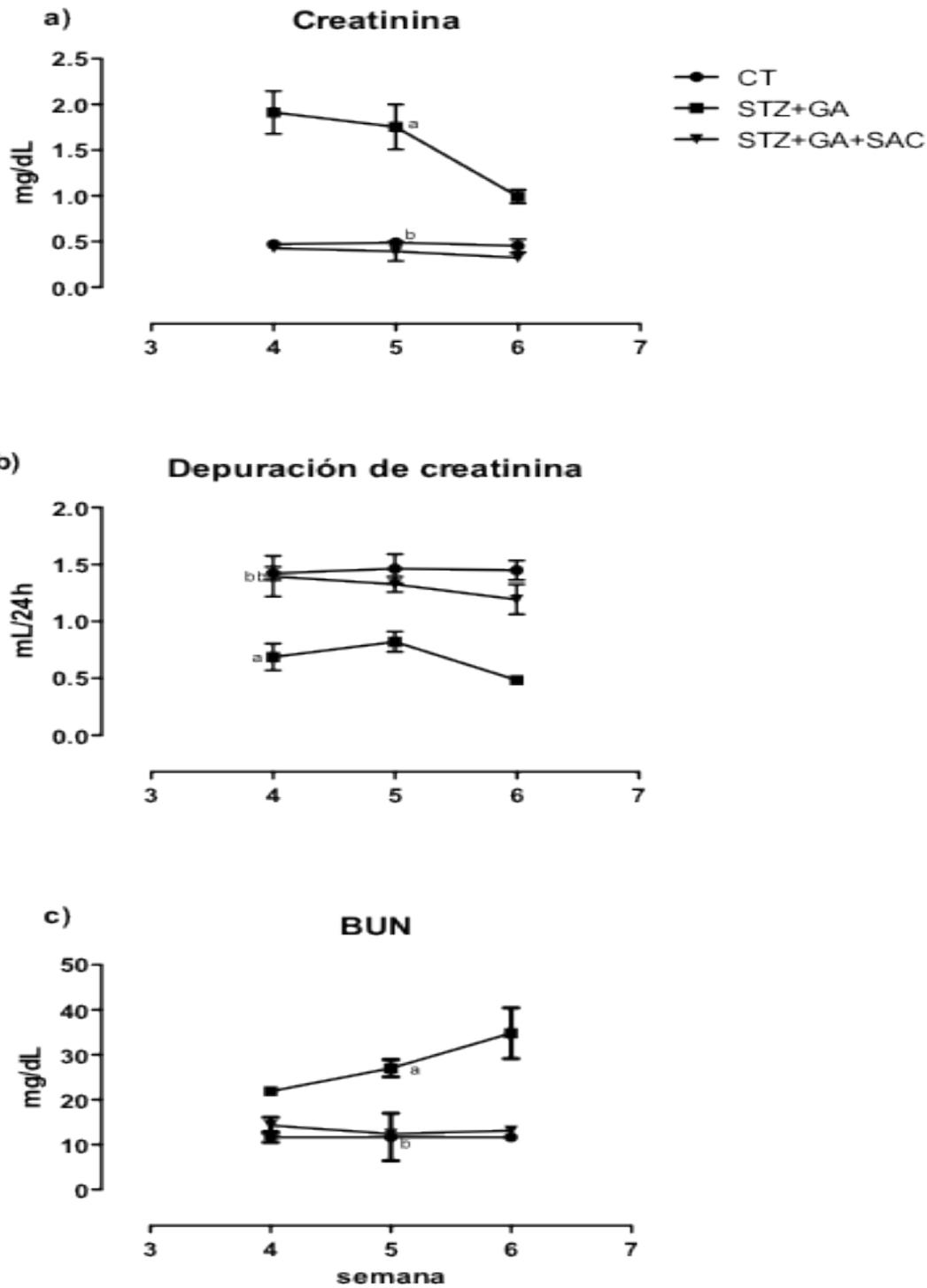


Figura 4: Evaluación del daño renal por medio de marcadores de daño glomerular: creatinina en suero, depuración de creatinina y nitrógeno de urea en sangre. CT: grupo control; STZ+GA: grupo tratado con STZ y dieta hipercalórica (15% de grasa y 15% de azúcar); STZ+GA+SAC: grupo tratado con STZ, dieta hipercalórica y SAC. Promedio \pm EEM. n = 2-4. a: $P < 0.05$ vs CT y b: $P < 0.05$ vs STZ+GA. a) **Creatinina en suero:** Tratamiento $P < 0.0001$, Tiempo $P = 0.0486$ b) **Depuración de creatinina:** Tratamiento $P = 0.0003$, Tiempo $P = 0.0210$ c) **Nitrógeno de urea en sangre:** Tratamiento $P < 0.0001$, Tiempo $P = 0.0430$.

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

Las ERO desempeñan un importante papel en el desarrollo de la IR, por lo que era necesario el evaluar en este trabajo el estrés oxidante mediante la actividad de las enzimas antioxidantes más importantes (SOD, GPx, CAT).

9.1.5. Actividad de las enzimas antioxidantes en el riñón

La actividad de la enzima GPx (Figura 5a) del grupo CT fue normal (**Maldonado et al., 2003**) y en el grupo STZ+GA la actividad de GPx fue más del doble con respecto al grupo CT ($P<0.05$). El grupo STZ+GA+SAC mostró una disminución de la actividad de GPx con respecto al grupo STZ+GA y es semejante al grupo CT.

La administración de la SAC tuvo un efecto protector en la actividad de la enzima GPX.

En la figura 5b, se observa que los niveles de actividad de CAT en el grupo CT fueron normales (**Maldonado et al., 2003**), los niveles de CAT del grupo STZ+GA disminuyeron significativamente respecto al grupo CT ($P<0.05$). Los niveles del grupo STZ+GA+SAC fueron similares a los del grupo CT.

Por lo que podemos decir que la SAC tiene un efecto protector total en cuanto a la actividad enzimática de CAT en el modelo de nefropatía diabética.

En cuanto a la actividad de la enzima SOD (Figura 5c) no se observó una diferencia entre los grupos estudiados (CT, STZ+GA y STZ+GA+SAC).

La elevación de glucosa puede favorecer la glicación de proteínas, promoción de la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) y formación de especies reactivas de oxígenos y estimular el estrés oxidante (**Orasanu & Plutzky, 2009**). El estrés oxidante es prevalente en las enfermedades renales y se considera un mecanismo patogénico importante (**Small et al., 2012**).

En la literatura se reporte la reducción de las actividades de GPx (**Saravanan y Ponmurugan, 2011**), debido al bajo contenido de glutatión que se encuentra en estado diabético, ya que el glutatión es un sustrato y cofactor de GPx. Sin embargo, en este estudio se observó un aumento en los niveles de GPx en el grupo STZ+GA lo cual se puede deber a que es una de las principales defensas endógenas naturales contra las ERO y mantener la homeóstasis del glutatión es crítico para un entorno celular rédox o que en la síntesis del glutatión en el riñón constituye la principal fuente de glutatión para las células (**Small et al., 2012**). Por lo que podemos decir que el organismo quizá esté aumentando la actividad de esta enzima para contrarrestar el daño producido por la nefropatía diabética y la SAC es capaz de evitar este aumento de la actividad de GPx en las ratas diabéticas.

La disminución en la actividad de CAT podría resultar de la inactivación por la glicación de la enzima. La CAT reduce el peróxido de hidrógeno producido por la reacción de dismutación. También evita la generación de radicales hidroxilo protegiendo así a los constituyentes celulares del daño oxidante en los peroxisomas.

En este estudio se observó una reducción de la actividad de CAT en las ratas del grupo STZ+GA, estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura (**Saravanan y Ponmurugan, 2011**), y se puede deber a la acumulación de H_2O_2 , que produce efectos deletéreos. También se observó que la administración de la SAC causó un aumento significativo en la actividad de CAT en el grupo STZ+GA+SAC, por lo que podemos decir que la SAC tiene un efecto protector total en cuanto a la actividad enzimática de CAT en el modelo de nefropatía diabética.

La SOD es una enzima importante de defensa que cataliza la dismutación de radicales superóxido para producir H_2O_2 y oxígeno molecular, por lo que se ha sugerido que los radicales libres de oxígeno la podrían inactivar o reducir su actividad en tejido. Saravanan y Ponmurugan (**2011**) reportaron una disminución de SOD en tejidos de ratas diabéticas inducidas por STZ, por lo cual esperábamos que hubiera una disminución de la actividad de SOD en el grupo STZ+GA. Sin embargo, este estudio no se observó diferencia en los grupos estudiados y esto puede deberse a que tal vez a que el H_2O_2 se está metabolizado por la GPx, por lo que ya no se lleva a cabo la generación del radical hidroxilo.

Por lo que la SAC tiene un efecto protector en cuanto a la actividad de las enzimas, re-estableciendo los niveles de actividad de CAT y GPx (**Hsu, 2004**), ya que los valores obtenidos fueron similares a los del grupo CT.

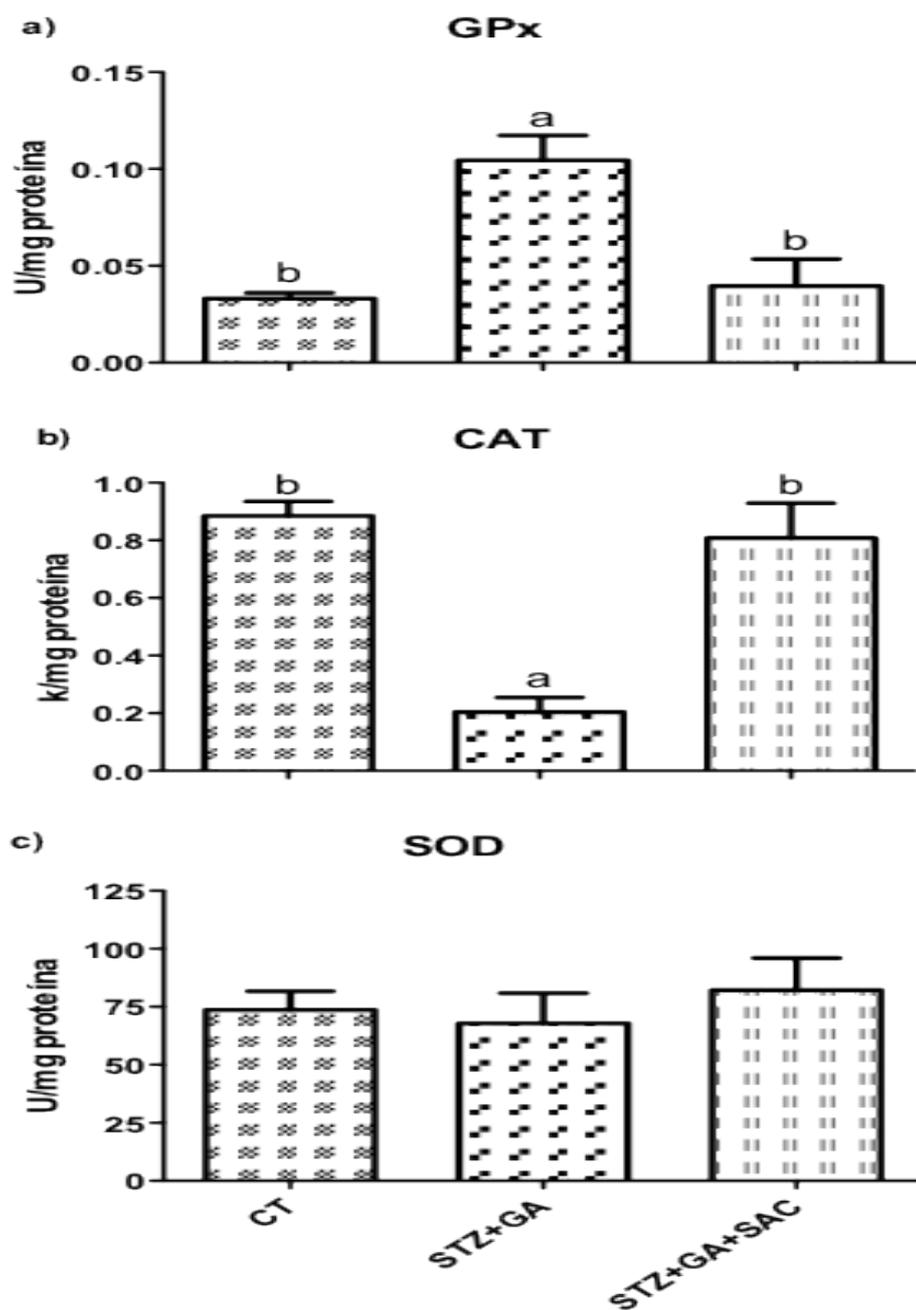


Figura 5: Evaluación del estrés oxidante por medio de la actividad de enzimas antioxidantes en el riñón. Resultado de las actividades de glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa en IR inducida por la diabetes mellitus. CT: grupo control; STZ+GA: grupo tratado con STZ y dieta hipercalórica (15% de grasa y 15% de azúcar); STZ+GA+SAC: grupo tratado con STZ, dieta hipercalórica y SAC. Promedio \pm EEM. n = 2-4. a: $P < 0.05$ vs CT y b: $P < 0.05$ vs STZ+GA. a) Glutatión peroxidasa $P = 0.0011$ b) Catalasa $P < 0.0001$ c) Superóxido dismutasa $P = 0.4361$

9.1.6. Estructura renal

Se realizaron estudios histológicos de los riñones de las ratas para determinar el daño estructural tubular (Figura 7). El daño se localizó en los túbulos proximales. Se observaron como marcadores de daño: células hinchadas y túbulos dañados (presencia de vacuolas, detritus y el hinchamiento son características de la necrosis).

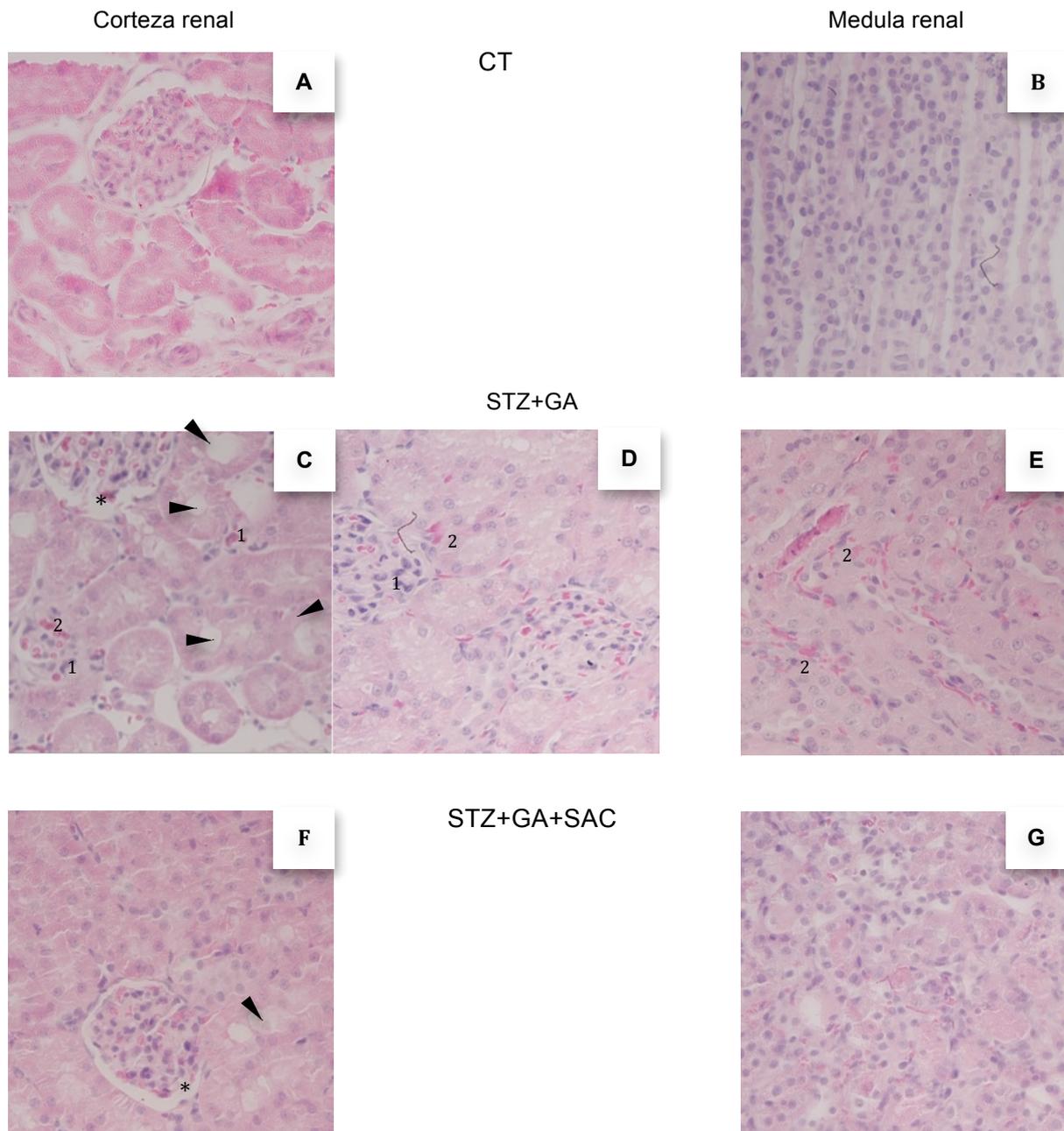


Figura 7. Evaluación del daño estructural por medio de un estudio histológico de riñones. Fotos representativas de la corteza renal y médula renal. CT: grupo control; STZ+GA: grupo tratado con STZ y dieta hipercalórica (15% de grasa y 15% de azúcar); STZ+GA+SAC: grupo tratado con STZ, dieta hipercalórica y SAC. Se observan vacuolas en las células tubulares proximales (>), disminución de capsula de Bowman (*), detritus (1), cilindros hialinos (2) H&E. 400X.

En la Figura 7 se observan fotos representativas de la corteza renal (Figura 7A, 7C, 7D 7F) y de la médula renal (Figura 7B, 7E y 7G) de los grupos estudiados y se determinó el daño histológico. Se observa que el grupo CT (Figura 7A y 7B) no hay alteración histológica, es decir, se muestran los túbulos y glomérulos normales **(Maldonado *et al.*, 2003; Saravanan y Ponmurugan, 2011)**.

En el grupo STZ+GA se observó daño en la corteza renal (Figura 7C y 7D), se encontraron vacuolas en las células epiteliales de los túbulos proximales, detritus y cilindros. Estas son características de la presencia de necrosis tubular aguda. En el glomérulo se observó reducido el espacio de Bowman, esto nos indica que la función se encuentra disminuida debido a que se filtra menor cantidad de volumen. Esto coincide perfectamente con la disminución de la función que observamos en los parámetros de función renal (CS, DC y BUN). Se observa en la médula renal (Figura 7E) atrofia tubular en el grupo STZ+GA, es decir presencia de cilindros, los cuales son acumulaciones de restos celulares (detritus) que forman una obstrucción (cilindro) del flujo del filtrado, ocasionando disminución de la filtración glomerular.

En el grupo STZ+GA+SAC se observa disminución del daño estructural en la corteza renal (Figura 7F) respecto al grupo STZ+GA, ya que casi no se presentan vacuolas en las células epiteliales, no hay presencia de detritus ni cilindros hialinos. También se observa que en la médula renal (Figura 7G) del grupo STZ+GA+SAC la atrofia tubular disminuyó respecto al grupo STZ+GA.

Estos resultados nos indican que en el grupo STZ+GA hay necrosis tubular y se puede deber a la pérdida gradual de la energía renal a través del desarrollo de la disfunción mitocondrial por el aumento de el estrés oxidante, dando como características la atrofia tubular, glomeruloesclerosis, vasculopatía renal y reducción de las capacidad regenerativa renal **(Small *et al.*, 2012)**. Esta reacción es provocada por el aumento de la producción de intermediarios altamente reactivos después de la administración de la STZ **(Saravanan y Ponmurugan, 2011)**. La patología anterior se redujo con la administración de la SAC, lo que nos indica que la SAC previno parcialmente la IR.

10. Resumen de resultados

- Se estableció un modelo de IRA inducida por la DM en ratas, mediante la pre-sensibilización con una dieta hipercalórica (alta en glucosa y grasa) y la administración de STZ.
- Se observó que el antioxidante empleado (SAC) disminuyó los niveles de colesterol, glucosa y triglicéridos.
- Se determinó que la SAC previno totalmente el aumento de CS y la disminución de DC; además la SAC previno parcialmente el aumento de BUN ocasionados por la DM.
- Se determinó que la disminución de la actividad enzimática de CAT como consecuencia de la IRA por la DM fue prevenida totalmente por la administración de la SAC. El aumento de la actividad GPx solo fue prevenida de manera parcial y la actividad de SOD no se modificó por acción de la SAC.
- La administración de SAC disminuyó el daño estructural en los riñones de ratas con IRA por la DM.

11. Conclusión

La S-alil cisteína contribuye a disminuir los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos; evita el cambio de la actividad de enzimas antioxidantes; y evita parcialmente el daño renal funcional y estructural en ratas con insuficiencia renal por la diabetes mellitus.

12. Referencias

1. Aebi HE. (1982). Catalase, In: Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weimheim.
2. Atkins RC., Zimmet P. (2010). Diabetic kidney disease: Act now or pay later. Saudi J Kidney Dis Transpl, 21: 217-21.
3. Allison, G., Lowe, G., Rahman, K. (2006). Aged garlic extract and its constituents inhibit platelet aggregation through multiple mechanisms. J Nutr, 136: S782-8.
4. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. J Nutr, 131: 955S-962S.
5. Aruoma, OI. (1996). Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. Free Radic Biol Med, 20: 675-70.
6. Babior, BM. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). N Engl J Med, 298: 659-668.
7. Bast A., Haenen GR., Doelman CJ. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest, 47: 412-426.
8. Batell LM., Yuen VG., Verna S., McNeill JH. (1999) Other models of type I diabetes. In Experimental Models of Diabetes. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York USA, 219-229.
9. Baud, L., Ardaillou, R. (1993). Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. Br Med Bull, 49: 621-629.
10. Baynes, JW., Torpe SR. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications a new perspective on an old paradigm. Diabetes, 48:1-9.
11. Bedoya, FJ., Solano F., Lucas, M. (1996). N-Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. Experientia, 52: 344-346.
12. Berginc, K., Zakelj, S., Ursic, D., Kristl, A. (2009). Aged garlic extract stimulates p-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 mediated effluxes. Biol Pharm Bull, 32: 694-699.
13. Betteridge, DJ. (2000). What is oxidative stress? Metabolism 49: 3-8.
14. Bickers, DR., Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. J Invest Dermatol, 126: 2565-2575.
15. Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. J Nutr, 131: 1010S-1015S.

16. Brenner, B. (2005). El riñón. Tratado de nefrología. USA: Elsevier. 3-60
17. Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., Amadori, D., Avellini, C., Bianchi, S., Biserni, R. Cipriani, F. (1989). A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int J Cancer*, 44: 611-616.
18. Burk, RF. (1990). Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmacol Ther*, 45: 383-385.
19. Cabrera E., Suárez L., Díaz O., Díaz O. (2000). Nuevos criterios para clasificar la diabetes mellitus. *Rev. Cubana Endocrinol*, 11 :51-5.
20. Cárdenas-Rodríguez N., Pedraza-Chaverrí J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17: 164-173.
21. Cheng, L., Kellogg, EW., Packer., L. (1981). Photoinactivation of catalase *Photochem Photobiol*, 34: 125-129.
22. Chuah SC., Moore PK., Zhu YZ. (2007). S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H2693-H2701.
23. Davies KJ., Sevanian A., Muakkassah-Kelly SF., Hochstein P. (1986). Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J*, 235: 747-754.
24. Deno H., Kato A., Shinozaki K., Sugiura M. (1982). Nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for elongator tRNAMet and tRNAVal (UAC): the tRNAVal (UAC) gene contains a long intron. *Nucleic Acids Res*, 10: 7511-7520.
25. Diplock AT., Charleux JL., Crozier-Willi G., Kok FJ., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Viña-Ribes J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*, 1: S77-S112.
26. Eberhardt, MK. (2001). Reactive oxygen metabolites, chemistry and medical consequences. *Crc Florida USA*, 10-149.
27. Efendy, JL., Simmons, DL., Campbell, GR., Campbell, JH. (1997). The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 132: 37-42.
28. Fausto Guerra J., Valdez López RM., López Zermeño MdC., Aldrete Rodríguez, MG. (2006). Antecedentes históricos sociales de la obesidad en México. *Investigación en Salud*, 8: 91-94.

29. Freeman BA., Crapo JD. (1996). Radicals generated by bone cutting and fracture. *Free Radic Biol Med*, 20:831-835.
30. Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*, 97:5S-13S.
31. Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Seki, T. A. (2008). Thermostability of alliin determined by chemical and biological assays. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72: 2877-2883.
32. Gapter, LA., Yuin, OZ., Ng, KY. (2008). S-allylcysteine reduces breast tumor cell adhesion and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*, 367: 446-451.
33. Geneser, Finn. (2000). *Histología. Panamericana*, 555-578.
34. Gibson, D., Hawrylko, J., McCay, B. (1985). GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system wich protects cell membranes. *Lipids*, 20, 704-711.
35. Hall, JE. (2011). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Elsevier*, 296-301.
36. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (2001). *Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press US*, 36-104.
37. Hansberg, W. (2002). *Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico*, 26: 19-54.
38. Hernando, L. (2009). *Nefrología clínica. Panamericana*, 3-9, 19-34.
39. Hugues Hernandorena, B., Rodríguez González JC., Rodríguez García JC., Marrero Rodríguez MT. (2002) *Animales de laboratorio en la Endocrinología. Biomodelos de las enfermedades tiroideas*. 13: 0-0.
40. <http://ensanut.insp.mx>
41. Ishikawa, H., Saeki, T., Otani, T., Suzuki, T., Shimosuma, K. (2009). Aged garlic extract prevents a decline of NK cell number and activity in patients with advanced cancer. *J Nutr*, 136: 816S-820S.
42. Kalayarasan, S., Sriram, N., Sureshkumar ., Sundhandiran, G. (2008). Chromium (VI)- induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. *J Appl Toxicol*, 28: 908-919.
43. Karnieli, E. D. D. Y., Hissin, P. J., Simpson, I. A., Salans, L. B., y Cushman, S. W. (1981). A possible mechanism of insulin resistance in the rat adipose cell in streptozotocin-induced diabetes mellitus. Depletion of intracellular glucose transport systems. *Journal of Clinical Investigation*, 68: 811.

44. Koderá, Y., Suzuki, A., Imada, O., Kasuga, S., Sumioka, I., Kanezawa, A., Taru, N., Fujikawa, M., Nagae, S., Masamoto, K., Maeshige, K., Ono, K. (2002). Physical, chemical, and biological properties of S-allylcysteine, an amino acid derived from garlic. *J Agric Food Chem*, 50: 622-632.
45. Konigsberg, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidante. Aplicaciones médicas. México: El Manual Moderno, 319-327.
46. Lamm, DL., & Riggs, DR. (2001). Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *J Nutr*, 131: 1067S-1070S.
47. 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), 176-209.
48. Li, JM., Mullen, AM., Yun, S., Wientjes, F., Brouns, GY., Thrasher, AJ., & Shah, AM. (2002). Essential role of the NADPH oxidase subunit p47 (phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Cir Res*, 90: 143-150.
49. Liochev, S., Fridovich, I. (1994). The role of O₂⁻ in the production of HO in vitro and in vivo. *Free Rad Bio Med*, 16: 29-33
50. 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.
51. López, M. (2007). El ajo: propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM*, 26: 78-81.
52. Loredó, E. (2006). Estudio de la nefropatía diabética en ratas, 1-3.
53. Luo, G., Qi, D., Zheng, Y., Mu, Y., Yan, G., Yang, T., Shen, JC. (2001). ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Lett*, 492: 29-32.
54. Maldonado, PD., Chavez-Cardenas, ME., Pedraza-Chaverrí, 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.
55. Maldonado, PD., Barrera, D., Rivero, I., Mata, R., Medina-Campos, ON., Hernández-Pando, R., Pedraza-Chaverrí, J. (2003). Antioxidante S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med*, 32: 317-324

56. 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: 107-111.
57. Mates, JM., Pérez-Gómez, C., Núñez De Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochem*, 32: 595-603.
58. Mcintosh, CHS., Pederson, RA. (1999). Non-insulin-dependent animal models of diabetes mellitus. IN: McNeill, J.H. *Experimental Models of Diabetes*. CRC Press LLC, 337-398.
59. Moriguchi, T., Takasugi, N., Itakura, Y. (2001). The effects of aged garlic extract on peroxidation and the deformability of erythrocytes. *J Nutr*, 131: 1016S-1019S.
60. Nagae, S., Ushijama, M., Hatono, S., Imai, J., Kasuga, S., Matsuura, H., Itakura, Y., Higashi, Y. (1994). Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. *Planta Med*, 60: 214-217.
61. Nakagawa, S., Kasuga, S., Matsuura, H. (1988). Prevention of liver damage by aged garlic extract and its constituents in mice. *Phytother Res*, 1: 1-4.
62. Navarro, J. (2003). Nefropatía diabética: ¿Una cuestión de inflamación? Hipótesis del daño renal inflamatorio en la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología*, 23: 381–389.
63. Nordberg, J., Arnér, E. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31: 1287- 1312.
64. Numagami, Y., Sato, S., Ohnishi, ST. (1996). Attenuation of rat ischemia brain damage by aged garlic extracts: a possible protecting mechanism as antioxidants. *Neurochem Int*, 29: 135-143.
65. Oberley, L., Spitz, D. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*, 105: 457-464.
66. Ohnishi, S., Ohnishi, T. (2001). In vitro effects of aged garlic extract and other nutritional supplements on sickle erythrocytes. *J Nutr*, 131: 1085S-1092S.
67. Pacher, P., Beckman, JS., Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87: 315-424.
68. Pedraza-Chaverrí, 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.

69. Pedraza-Chaverrí, J., Granados-Silvestre, M., Medina-Campos, O., & Hernández-Pando, R. (1999). Effect of the in vivo catalase inhibition on aminonucleoside nephrosis. *Free Radic Biol Med*, 27: 245-253.
70. Papaccio, G., Psiante, FA., Frascatore, S. (1986) Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin. *Diabetes*, 35: 470-474.
71. Rahman, K., Lowe, GM. (2006). Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J. Nutr*, 136: 736S-740S.
72. Revilla, MC., Islas, AS. (2005). Diabetes Mellitus: El laboratorio clínico y su utilidad en el paciente con diabetes mellitus. MC Graw-Hill Interamericana. 223-245.
73. Rhun, LY., Kirkland, JB., Shah, GM. (1998). Cellular responses to DNA damage in the absence of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochemical and Bioph Res Comm*, 245:1–10.
74. Rieger, J., Shan, A., Giddy, J. (2002). Ischemia-Reperfusion injury of retinal endothelium by cyclooxygenase and xanthine oxidase-derived superoxide. *Exp Eye Res*, 74, 493-501.
75. Rovin, BH., Wurst, E., Kohan, DE. (1990). Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int* 37:1509- 1514.
76. Sánchez, L. (1993). Insuficiencia renal aguda. Aspectos clínicos. España: Ediciones Norma. 548-588.
77. 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. *ArchToxicol*, 81: 173-182.
78. Saravanan, G., y Ponmurugan, P. (2011). Ameliorative potential of S-allyl cysteine on oxidative stress in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 189: 100-106.
79. Saravanan, G., y Ponmurugan, P. (2012). Ameliorative potential of S-allylcysteine: Effect on lipid profile and changes in tissue fatty acid composition in experimental diabetes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64: 639-644.
80. Saravanan, G., Ponmurugan, P., Senthil Kumar, G. P., & Rajarajan, T. (2010). Antidiabetic effect of S-allylcysteine: Effect on plasma and tissue glycoproteins in experimental diabetes. *Phytomedicine*, 17: 1086-1089.

81. Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 11: 173-186.
82. Schrier, RW. (1999). *Atlas of Diseases of the Kidney*. Department of Medicine, University of Colorado School of Medicine Denver. 11.
83. Schrier, R., Wang, W., Poole, B., Mitra, A. (2004). Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*, 114: 598-611.
84. Segoviano-Murillo, S., Sánchez-González, DJ., Martínez-Martínez, CM., Cruz, C., Maldonado, PD., Pedraza-Chaverrí, J. (2008). S-allylcysteine ameliorates ischemia and reperfusion induced damage. *Phytother Res*, 22: 836-840.
85. Sevanian, A., Davies, KJ., Hochstein, P. (1985). Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *Free Radic Biol Med*, 1: 117-124.
86. Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, CL., Ramarao, P. (2005) Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, 52 :313–320.
87. Steiner, M., Lin, R. (1998). Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J. Cardiovasc Pharmacol*, 31: 904-908.
88. Steiner, M., Khan, A., Holbert, D., Lin, R. (1996). A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effects of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *AM J Clin Nutr*, 64: 866-870
89. Sumioka, I., Matsuura, T., Kasuga, S., Itakura, Y., Yamada, K. (1998). Mechanisms of protection by S-allyl mercaptocysteine against acetaminophen-induced liver injury in mic. *Jpn J Pharmacol*, 78: 199-207.
90. Sumiyoshi, H. (1997). New pharmaceutical activities of garlic and its constituents. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 110: 93P-7P.
91. Sunderesan, S., Subramanian, P. (2008). Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by S-allylcysteine. *Moll Cell Biochem*, 310: 209-214.
92. Symons, MC. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*, 91: 2S-13S.

93. Takano, S., Aramaki, Y., Tsuchiya, S. (2001). Lipoxygenase may be involved in cationic liposome-induced macrophage apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 116-120.
94. Tietz, N.W. (1987). *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 3rd Ed. Philadelphia; W.B. Saunders.
95. Tisher, C.C., Hostetter T.H. (1994) Diabetic nephropathy. In: Tisher C.C., Brenner B.M. (eds.), *Renal Pathology 2*, 1387, Lippincott Co., Philadelphia. 1387–1412.
96. Tresseler, K.M. (1998). *Laboratorio clínico y pruebas diagnósticas*. México: El manual moderno. 336-338.
97. Ushijima, M., Sumioka, I. (1997). Effect of garlic and garlic preparations on physiological and psychological stress in mice. *Phytother Res*, 22: 226-230.
98. Vázquez, V.B., Meza, M. (2005). Nefropatía diabética en diabetes mellitus. *Mc Graw-Hill Interamericana*. 330-347.
99. Velázquez, M., Prieto, B., Contreras, R. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *Ciencias*, 75: 36-43.
100. Wang, J., Wang, H., Hao, P., Xue, L., Wei, S., Zhang, Y., & Chen, Y. (2011). Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Molecular Medicine*, 17: 172-179.
101. Wells, P.G., Bhuller, Y., Chen, C.S., Jeng, W., Kasapinovic, S., Kennedy, J.C., Kim, P.M., Laposa, R.R., McCallum, G.P., Nicol, C.J., Parman, T., Wiley, M.J., Wong, A.W. (2005). Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *ToxicolApplPharmacol*, 207: 354-366.
102. Xiong, Y., Rabchevsky, A.G., Hall, E.D. (2007). Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem*, 100: 639-649.
103. You, W., Blot, W. (1988). Diet and high risk of stomach cancer in Shandong, China. *Cancer Res*, 48: 3518-3523.
104. Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74: 139-162.
105. Zanón, V. (2008). Estrés oxidante en el glaucoma primario de ángulo abierto. *Prevención de la ceguera por glaucoma*. Servei de Publicacions. 27-30.

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