

L



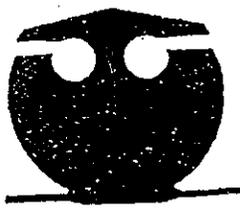
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO RENAL
EN LA NEFROTOXICIDAD POR DICROMATO
DE POTASIO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
RAYMUNDO CLEMENTE CARBAJAL CANO



FACULTAD
DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio 209 del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría del Dr. José Pedraza Chaverri.

Este proyecto fue apoyado por CONACYT (25441-M) y DGAPA (IN210201).

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS ERO	9
2.1.1 Anión superóxido	9
2.1.2 Radical hidroxilo	9
2.1.3 Peróxido de hidrógeno	10
2.1.4 Singulete de oxígeno	11
2.2 DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	11
2.2.1 Sistema antioxidante no enzimático	12
2.2.2 Sistema antioxidante enzimático	13
2.2.2.1 Superóxido dismutasa	13
2.2.2.2 Catalasa	14
2.2.2.3 Glutatión peroxidasa	14
2.2.2.4 Peroxirredoxinas	16
2.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN RENAL	17
2.3.1 La nefrona	18
2.4 INSUFICIENCIA RENAL AGUDA	20
2.5 DICROMATO DE POTASIO	22
2.5.1 Necrosis tubular aguda mediada por dicromato de potasio	23
2.5.2 Participación de especies reactivas de oxígeno en la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio	24
2.5.3 Enzimas antioxidantes en la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio	26
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	26
4. HIPÓTESIS	27
5 OBJETIVO GENERAL	27
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 REACTIVOS	28
6.2 ANIMALES	28
6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	28
6.4 MÉTODOS	29
6.4.1 Determinación de cromo en plasma y en riñón	29
6.4.2 Evaluación del daño renal	30
6.4.2.1 Evaluación de la función glomerular	30
6.4.2.2 Evaluación del daño tubular	30
6.4.2.2.1 Evaluación funcional del daño en el túbulo proximal	30
6.4.2.2.2 Evaluación estructural del daño tubular	31
6.4.3 Valoración del estrés oxidativo mediante la localización inmunohistoquímica de nitrotirosina	31
6.4.4 Determinación de las actividades de las enzimas antioxidantes	32

6.4.4.1 Actividad de la enzima superóxido dismutasa	32
6.4.4.2 Actividad de la enzima glutatión peroxidasa	32
6.4.4.3 Actividad de la enzima glutatión reductasa	32
6.4.4.4 Actividad de catalasa	33
6.4.4.5 Actividad de tiorredoxina reductasa	33
6.4.4.6 Actividad de peroxirredoxinas	33
6.4.5 Cantidad de proteína de las enzimas antioxidantes	33
6.4.6 Localización inmunohistoquímica de las enzimas antioxidantes SOD Cu/Zn, SOD Mn y catalasa	34
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
7. RESULTADOS	35
7.1 PESO CORPORAL, VOLUMEN URINARIO Y CONCENTRACIÓN DE CROMO	35
7.2 CARACTERIZACIÓN DE LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA	37
7.2.1 Parámetros de la función glomerular	37
7.2.2 Parámetros para evaluar la función tubular	38
7.2.3 Daño histológico	40
7.3 DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO	42
7.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	44
7.4.1 Superóxido dismutasa	44
7.4.2 Glutatión peroxidasa y glutatión reductasa	48
7.4.3 Catalasa	49
7.4.4 Tiorredoxina reductasa	51
7.4.5 Peroxirredoxinas	52
8. DISCUSIÓN	53
8.1 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN GLOMERULAR	54
8.2 EVALUACIÓN DEL DAÑO TUBULAR	55
8.3 EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO	56
8.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES	56
9. CONCLUSIONES	59
10. BIBLIOGRAFÍA	60

1. RESUMEN

ANTECEDENTES. La insuficiencia renal aguda (IRA) es una enfermedad que se caracteriza por la disminución abrupta de la filtración glomerular y la acumulación de productos finales del metabolismo. Existen varios factores que pueden inducir el desarrollo de esta enfermedad, entre los cuales están algunos agentes tóxicos como el dicromato de potasio. El empleo de este compuesto es utilizado como modelo experimental para estudiar y comprender la fisiopatología de la IRA. El dicromato de potasio es un compuesto altamente oxidante que, una vez dentro del organismo, sufre un proceso de reducción de la valencia (VI) a la valencia (III). En dicho proceso de reducción se generan especies reactivas de oxígeno las cuales se cree están involucradas en el mecanismo de inducción de la IRA. Sin embargo, en este modelo experimental, no se han realizado estudios de curso temporal para conocer la respuesta del sistema de defensa antioxidante enzimático, ni se conoce si existe alguna asociación entre los posibles cambios en las enzimas antioxidantes con las alteraciones funcionales y estructurales del riñón.

OBJETIVO. Estudiar, mediante un seguimiento temporal la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas, así como de las enzimas glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa las cuales son las encargadas de reducir al glutatión y a la tiorredoxina.

DISEÑO EXPERIMENTAL. La IRA se indujo mediante una inyección subcutánea única de dicromato de potasio (15 mg/kg de peso) a ratas de 200-250 g de peso. A las ratas control se les administró solución salina al 0.9%. Los grupos de animales tratados con el tóxico y sus respectivos controles se sacrificaron en los días 1, 2, 3, 4 y 6 posteriores a la inyección del tóxico. En los días de estudio se determinaron: el peso corporal, el volumen urinario, la cantidad de cromo en plasma y riñón, la función glomerular y el daño tubular, así como el estrés oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes.

RESULTADOS. El peso de los animales fue similar en ambos grupos a lo largo del estudio. El volumen de orina aumentó a partir del tercero manteniéndose elevado hasta el sexto día. Por su parte, el cromo en el plasma alcanzó su valor máximo en el día 1 disminuyendo gradualmente hasta alcanzar valores no diferentes al control en el día 6, mientras que el cromo en riñón aumentó en el día 1 para disminuir paulatinamente hasta el cuarto día, pero permaneció elevado hasta el final del estudio. En cuanto a los marcadores de daño glomerular, la creatinina y el nitrógeno de urea en plasma aumentaron y la depuración de creatinina disminuyó los días 2-4. Con excepción del nitrógeno de urea los otros dos valores no fueron diferentes a los controles en el día 6. Con respecto al daño tubular, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa plasmática disminuyó en todos los tiempos estudiados. La excreción urinaria de la enzima N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y de proteínas alcanzó un valor máximo en

el segundo día y después disminuyó hasta valores similares al control al final del estudio. El análisis histológico indicó que en el segundo día hubo mayor daño a nivel de túbulo proximales y a partir del tercer día se observó una regeneración evidente del daño. Todos los datos anteriores mostraron que sí se indujo la insuficiencia renal aguda. El estudio inmunohistoquímico que detecta nitrotirosinas como marcador de estrés oxidativo, indicó que el segundo día, posterior a la inyección del tóxico, fue el tiempo de mayor estrés oxidativo. En cuanto a las enzimas antioxidantes en el riñón, se encontró que la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) no se modificó durante el estudio, al igual que la cantidad de proteína de la isoforma dependiente de cobre y zinc (SODCu/Zn). En cambio, la cantidad de proteína de la isoforma dependiente de manganeso (SODMn) disminuyó significativamente, pero sólo en el sexto día del estudio. Por su parte, la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) disminuyó a partir del cuarto día, mientras que la actividad de la glutatión reductasa (GR) disminuyó a partir del segundo día. En el caso de la catalasa, tanto su actividad como la cantidad de proteína disminuyeron a partir del segundo día. Finalmente, la actividad de las peroxirredoxinas no cambió a lo largo del estudio, mientras que la actividad de la tiorredoxina reductasa (TrxR) sólo disminuyó el sexto día. En este estudio temporal ninguna de las enzimas antioxidantes estudiadas aumentó a pesar del estrés oxidativo producido por la inyección de dicromato de potasio. A pesar del intenso daño funcional y estructural en los túbulo en el día 1, ninguna de las enzimas antioxidantes se modificó en este tiempo. En el día 6, cuando hay una recuperación estructural y funcional casi total, las enzimas antioxidantes catalasa, SODMn, GPX, GR y TrxR permanecen bajas.

CONCLUSIONES. El estrés oxidativo inducido por el dicromato de potasio no promovió un aumento de la actividad y/o cantidad de las enzimas antioxidantes estudiadas. Por el contrario, la actividad de la mayoría de estas enzimas disminuyó en uno o varios de los días estudiados. En este modelo experimental, la actividad de las enzimas antioxidantes se regula de manera diferencial y no se encontró una asociación entre la actividad de dichas enzimas y el daño renal. Se requieren más estudios para conocer las bases moleculares de la regulación diferencial de las enzimas antioxidantes en la insuficiencia renal aguda inducida por dicromato de potasio. Dado que la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y peroxirredoxinas no cambia en la etapa de regeneración, es posible que tengan un papel importante en la regeneración del daño.

2. INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno y son sintetizadas y degradadas por todos los organismos aeróbicos; su presencia juega un papel importante en el sistema inmune (1, 2) y como mediadoras en la regulación de la transducción de señales involucradas en procesos de diferenciación y crecimiento celular (3). Sin embargo, una producción desmedida genera un estado denominado estrés oxidativo, en donde las estructuras celulares pueden sufrir daño por alteraciones en las macromoléculas tales como:

1. **Proteínas.-** Al interactuar las ERO con las proteínas y al producirse la oxidación de los residuos de aminoácidos, se provocan cambios conformacionales que pueden generar una disminución parcial o total en su actividad (4, 5) y hacer que la proteína sea más susceptible a agregación y digestión proteolítica (6). Se ha demostrado que las ERO reaccionan con los residuos de prolina, histidina, arginina y cisteína (7, 8).
2. **Lípidos.-** Los radicales libres tienen la facultad de sustraer átomos de hidrógeno de ácidos grasos poliinsaturados, provocando la formación de enlaces dieno. Lo anterior induce alteraciones en la cohesividad de la membrana lipídica, así como en su organización estructural y como consecuencia pueden desencadenar alteraciones en las proteínas de membrana (6).
3. **Ácidos nucleicos.-** Las ERO pueden provocar hidroxilaciones de las bases (la timina y la citosina son las bases más susceptibles), entrecruzamiento y rompimiento de las cadenas de ADN. El rompimiento de las cadenas de ADN, el entrecruzamiento ADN-proteínas y la oxidación de las bases púricas y pirimídicas son ocasionados por la reacción con el radical hidroxilo. Lo anterior puede provocar mutaciones y/o inhibición de la expresión génica (8, 9).

En el cuadro siguiente se muestran varias fuentes, tanto endógenas como exógenas capaces de generar ERO en las células.

Cuadro 1. Fuentes generadoras de ERO en las células. Fuente (3).

FUENTES DE ERO	
ENDÓGENA	EXÓGENA
NAD(P)H oxidasa	Contaminantes ambientales
Mitocondria	Radiación ionizante
Peroxisomas	Luz ultravioleta
Citocromo P450	Campos eléctricos
Xantina oxidasa	Citocinas inflamatorias
Ciclooxigenasa	
Lipooxigenasa	
γ -Glutamil transpeptidasa	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1 TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS ERO

Se han descrito varios tipos de ERO, entre las que tenemos:

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

El anión superóxido es la primera especie reactiva de oxígeno formada durante la reducción univalente del oxígeno. Esta molécula se produce por la incorporación de un electrón a un orbital antiunión de la molécula de oxígeno y su fórmula química es $O_2^{\bullet -}$. Existen sistemas enzimáticos capaces de generar al anión superóxido, tales como el sistema xantina/xantina oxidasa (10), la lipooxigenasa (11), ciclooxigenasa (12) y la NADPH oxidasa (13), siendo las cadenas transportadoras de electrones la fuente más importante de generación del anión superóxido (3, 8). El anión superóxido tiene la facultad de interactuar con otras moléculas, como el peróxido de hidrógeno en presencia de trazas de algún metal de transición, para dar lugar a la formación de compuestos oxidantes más potentes como son el singulete de oxígeno y el radical hidroxilo (14). El anión superóxido posee la facultad de dismutar a peróxido de hidrógeno (15, 16) y, según algunos autores, en este proceso de dismutación también se puede generar el singulete de oxígeno (17). Las reacciones de dismutación consisten en la transferencia de un electrón de una molécula de superóxido a otra generando una molécula de peróxido de hidrógeno y una molécula de oxígeno. Se han propuesto tres posibles reacciones de dismutación:

- 1) $HO_2^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- 2) $HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- 3) $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Nota* el radical hidropéroxilo (HO_2^{\bullet}) es la forma protonada del anión superóxido.

Se ha observado que el proceso de dismutación ocurre muy rápido a pH 4.8; sin embargo, a pH fisiológico esta reacción es lenta (18).

2.1.2 Radical hidroxilo (OH^{\bullet}).

Este compuesto está considerado como el oxidante más potente en los sistemas biológicos debido a que reacciona con casi todas las moléculas biológicas (19).

La generación del radical hidroxilo (OH^{\bullet}) ocurre mediante dos vías. La primera denominada reacción de Fenton, se caracteriza por la interacción de metales de transición con el peróxido de hidrógeno (8, 12, 20); asimismo, en esta reacción el anión superóxido juega un papel importante en el reciclamiento de los iones metálicos:

en su habilidad de difundir a través de las membranas biológicas, tal como ocurre en las membranas mitocondriales (24). Es importante mencionar que el peróxido de hidrógeno tiene un papel trascendental en los procesos de señalización intracelulares (8).

2.1.4 Singlete de oxígeno (1O_2).

Esta molécula de oxígeno se caracteriza por no tener electrones desapareados, por consiguiente no es realmente un radical; sin embargo, es muy reactivo sobre todo con los lípidos de membranas produciendo radicales peroxilo. Es importante mencionar que esta molécula se forma después de la absorción de energía cuántica, o bien como resultado de determinadas reacciones químicas, trayendo como resultado el salto de un electrón a un orbital superior y formándose un suborbital con un par de electrones con giros opuestos y un suborbital vacío (14, 17, 18). Esta molécula tiene su origen cuando se iluminan determinados pigmentos en presencia de oxígeno (25), por ejemplo clorofila, retinal, flavinas y porfirinas. Es importante mencionar que esta molécula tiende a formarse en grandes cantidades en tejidos y órganos sometidos a radiaciones ionizantes terapéuticas (7).

En el cuadro 2 se muestra la vida media del oxígeno y sus especies reactivas:

Cuadro 2: Vida media de las ERO. Adaptado de (26).

VIDA MEDIA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO		
Especie	Símbolo	Vida media a 37°C/seg
Oxígeno molecular	O_2	$>10^2$
Anión superóxido	O_2^-	1×10^{-6}
Radical hidroxilo	OH^\cdot	1×10^{-9}
Singlete de oxígeno	1O_2	1×10^{-6}

Las ERO antes mencionadas se encuentran en un rango de concentración de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} M al ser generados por el metabolismo normal y no viajan muy lejos de los sitios de donde se originaron debido a que su vida media es de unos cuantos microsegundos (27).

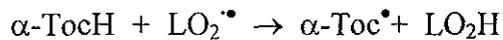
2.2 DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Las ERO generadas, ya sea bajo condiciones normales o bien en condiciones de estrés oxidativo, son capaces de afectar la estructura y función de las estructuras celulares como las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que puede conducir a daño y/o a la muerte celular (27). Sin embargo, las células poseen sistemas defensivos que les permiten controlar la concentración de las ERO. Estos sistemas defensivos son de dos tipos: sistemas antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.

2.2.1 Sistema antioxidante no enzimático.

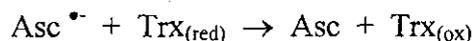
Se trata de algunos compuestos no proteínicos que poseen la capacidad de interactuar directamente con las especies reactivas de oxígeno; entre estos compuestos están:

A. Vitamina E (α -tocoferol): se le ha considerado como el antioxidante más distribuido en los seres vivos. Debido a que es un compuesto hidrofóbico, se encuentra en las membranas biológicas. La vitamina E tiene la capacidad de interrumpir la lipoperoxidación en su fase de propagación reaccionando con los radicales lipoperoxilos y los alcoxilos (3, 23, 28, 29).

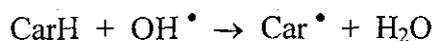


Se ha visto que de la interacción con lipoperoxidos se genera un radical α -tocoferilo el cual es reciclado a α -tocoferol al interactuar con el ácido ascórbico. También se ha observado que este compuesto tiene la capacidad de interactuar con el singulete de oxígeno y en menor grado con el radical superóxido, por lo que se piensa que puede proteger a las membranas de la acción oxidativa de las ERO (23).

B. Vitamina C (ácido ascórbico): es un compuesto hidrosoluble que se localiza tanto en el citosol de las células como en los fluidos extracelulares y se caracteriza por su capacidad de aceptar electrones, puede reaccionar directamente con el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^\bullet) (3, 30), trayendo como resultado la formación del radical ascorbilo, el cual puede ser reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (31, 32).



C. Vitamina A (β -caroteno): Es un compuesto liposoluble el cual se encuentra en las membranas lipídicas. Su función antioxidante consiste en impedir la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el singulete de oxígeno (33) y el radical hidroxilo, la interacción con estas especies reactivas de oxígeno generan al radical carotenilo (Car^\bullet) el cual, a su vez, puede ser reciclado al interactuar con el ácido ascórbico y/o α -tocoferol (23) ejemplo:



D. Glutati3n: Al glutati3n reducido se le ha considerado como un compuesto antioxidante ya que protege los grupos $-\text{SH}$ de las prote3nas de la acci3n oxidante de los radicales libres. Asimismo, el glutati3n tiene la capacidad de reaccionar con una amplia gama de compuestos electrof3licos y

oxidantes tales como H_2O_2 , $\text{O}_2\cdot^-$ y $\text{OH}\cdot$. El glutatión reducido neutraliza a los radicales libres al transferirles un átomo de hidrógeno (23, 34, 35).

E. Ácido úrico: A pesar de que es un producto final del metabolismo de las purinas en humanos, también posee propiedades antioxidantes; sin embargo, se desconoce el proceso mediante el cual ejerce su acción protectora. Algunos reportes sugieren que el ácido úrico forma complejos con metales de transición tales como el hierro y cobre cuando interacciona con el ascorbato (36, 37).

2.2.2 Sistema antioxidante enzimático.

Existen varias enzimas destinadas a convertir las ERO menos reactivas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno) en moléculas inocuas, antes de que promuevan la generación de moléculas más reactivas (radical hidroxilo y singulete de oxígeno), capaces de reaccionar y dañar las estructuras celulares. Entre las enzimas antioxidantes podemos citar a la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas.

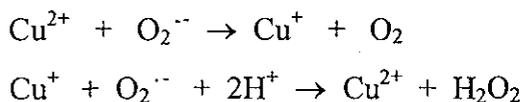
2.2.2.1 Superóxido dismutasa (SOD): La actividad de esta enzima está encaminada a catalizar la dismutación del anión superóxido y generar H_2O_2 .



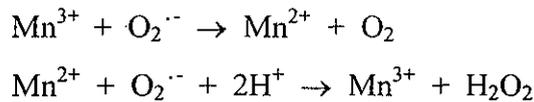
Se ha sugerido que la función de la enzima superóxido dismutasa es la de evitar la formación del singulete de oxígeno (17), mientras que otros autores indican que la actividad de esta enzima está encaminada a impedir la inhibición de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa por parte del anión superóxido (38).

Las isoformas de SOD son metaloenzimas de las cuales se han identificado tres; dos de estas enzimas poseen Cu y Zn (SODCu/Zn) y su localización es intra y extracelular, la tercera depende de Mn (SODMn) y su localización es intracelular. La isoforma dependiente de Cu y Zn que se localiza intracelularmente es una proteína homodimérica con un peso de 32- kDa y se localiza en el citoplasma, lisosomas, núcleo y, en menor cantidad, en el espacio intermembranal de la mitocondria (39). La segunda isoforma es homotetramérica, tiene un peso de 135-kDa y se localiza en los fluidos como plasma y líquido sinovial (40, 41).

El mecanismo catalítico de la SODCu/Zn se basa en el ciclo redox del catión cobre (42, 43):

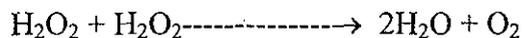


La SODMn es una proteína homotetramérica de 80-kDa que se localiza principalmente en la matriz mitocondrial (39) y su mecanismo catalítico se basa en el ciclo redox del catión manganeso (44, 45):

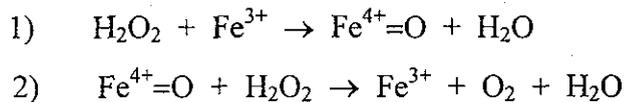


Se ha observado que la tasa de dismutación por actividad de la SOD es 1×10^4 veces más rápida que la dismutación espontánea (46, 47).

2.2.2.2 Catalasa (CAT): Esta enzima es una ferrohemo proteína tetramérica de aproximadamente 240-kDa y cataliza la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno molecular (48).



Esta proteína se localiza principalmente en los peroxisomas, pero también se ha encontrado en el citoplasma y mitocondrias (49). El papel antioxidante de la CAT consiste en disminuir el riesgo de la formación del radical hidroxilo por la interacción del peróxido de hidrógeno con metales de transición vía reacción de Fenton (50, 51). Esta enzima es más eficiente cuando hay relativamente altas concentraciones de peróxido de hidrógeno en la célula debido a que su K_m oscila en el rango milimolar. Su mecanismo catalítico consiste en dos fases. En la primera fase se lleva a cabo el rompimiento de una molécula de peróxido de hidrógeno generándose en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de agua; la segunda fase se caracteriza por la reacción de la especie oxoferrilo con otra molécula de peróxido de hidrógeno (52):



Se ha demostrado que esta enzima une NADPH el cual, según algunos autores, tiene una función dual, por una parte incrementa su eficiencia, por otra proporciona los electrones necesarios para avanzar a la fase dos del ciclo catalítico cuando los niveles de peróxido de hidrógeno son bajas (53, 54).

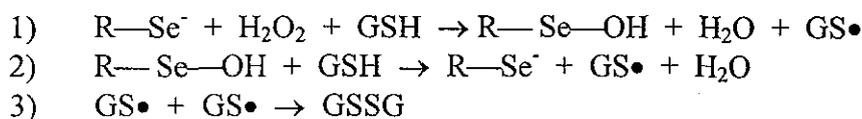
2.2.2.3 Glutación peroxidasa (GPX): Esta enzima es una proteína tetramérica que cataliza la reducción del H_2O_2 y de hidroperóxidos protegiendo a los componentes celulares del daño que pudieran generar estos compuestos oxidantes. La GPX es eficiente en la degradación de H_2O_2 cuando se encuentra en concentraciones relativamente altas, debido a que su K_m oscila en el rango milimolar. Se han

identificado hasta ahora cuatro isoformas de GPX. Todas las isoformas de GPX requieren de la presencia de glutatión reducido para poder llevar a cabo su función catalítica (7).

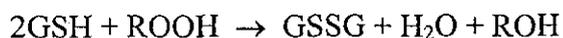
Isoformas de glutatión peroxidasa:

- a) Citosólica (cGSH-PX): Esta enzima es una selenoproteína que tiene una gran afinidad por H_2O_2 y en un menor grado por colesterol e hidroperóxidos de fosfolípidos (55).
- b) Plasmática (plGSH-PX): Es una glicoproteína que, antigénica y estructuralmente, es diferente a las demás isoformas de GPX reportadas, también es una selenoproteína. Se ha visto que los túbulos proximales del riñón son la principal fuente de síntesis de esta isoforma (56, 57). La función de esta proteína no ha sido bien establecida ya que el glutatión se encuentra en bajas concentraciones en el plasma ($0.3 \mu M$) (57).
- c) Gastrointestinal (glGSH-PX): Se trata de otra isoforma que se localiza intracelularmente y se encuentra principalmente en el tracto intestinal, también se ha encontrado en colon e hígado. Esta isoforma tiene una alta afinidad por hidroperóxidos orgánicos (58), se piensa que su función metabólica consiste en proteger al organismo de la acción nociva de hidroperóxidos orgánicos ingeridos (59).

Para estas 3 isoformas de glutatión peroxidasa se ha propuesto que el anión selenolato es oxidado a ácido selenénico, el cual, a su vez, es reducido por el glutatión (60):



d) Fosfolípidos (PlGSH-PX): Esta proteína se encuentra unida a membranas en forma de monómero y reduce hidroperóxidos de fosfolípidos y colesterol, se ha visto que tiene una menor afinidad que las otras isoformas por el glutatión reducido y su actividad se preserva aún en casos de deficiencia de selenio. Esta isoforma es abundante en testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (60). Se ha visto que el mecanismo catalítico de esta enzima requiere de la presencia de dos moléculas de glutatión para poder reducir una molécula del hidroperóxido:



Las reacciones catalíticas de las isoformas de glutatión peroxidasa generan glutatión oxidado, el cual es regenerado a glutatión reducido por la actividad de la enzima glutatión reductasa la que, a su vez, utiliza al NADPH como donador de electrones; de esta manera, se evita la disminución en los niveles del glutatión reducido (61) (Figura 1).

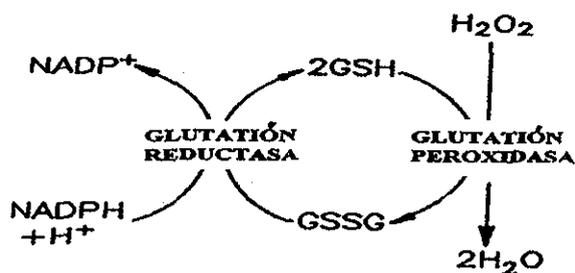


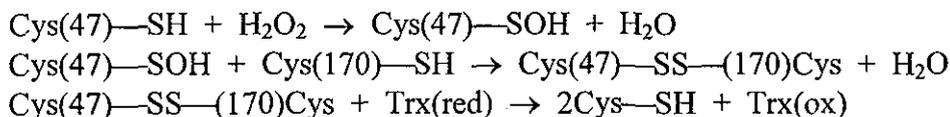
Figura 1: Actividad catalítica de la glutatión peroxidasa y regeneración del glutatión oxidado por la actividad de la glutatión reductasa.

2.2.2.4 Peroxirredoxinas (**Prx**): Las Prx son una gran familia de enzimas antioxidantes que son capaces de reducir directamente a los peróxidos como peróxido de hidrógeno y diferentes alquilhidroperóxidos (62, 63). Las Prxs son proteínas diméricas de aproximadamente 23 kDa que contienen residuos de cisteína reactivas en su sitio activo (Cys-47 y Cys-170 en las familias I-V de Prx) y son los responsables de llevar a cabo la reducción de peróxido de hidrógeno (64). Se han identificado seis distintas familias de Prx (Prx I-VI) de genes distintos en los tejidos de mamíferos (65). Estas enzimas (exceptuando a la familia VI) están acopladas al sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa que se encarga de reducir el sitio activo de las peroxirredoxinas una vez que éste se oxida (66). Las Prx forman parte del sistema redox que, junto con el sistema del glutatión (glutatión, glutatión reductasa, glutarredoxina y glutatión peroxidasa) controlan el estado redox de los grupos tioles esenciales.

La tiorredoxina reducida es capaz de regenerar la forma reducida de las Prx y la tiorredoxina reductasa tiene la habilidad de regenerar la forma reducida de la tiorredoxina a expensas del NADPH (67). Los miembros de la familia de las Prx que contienen dos residuos de cisteínas conservados (Prx I-V) tienen a la Trx como un donador inmediato de electrones (62, 63, 66, 67), mientras que en el caso de la familia VI que contiene un residuo de cisteína conservado; se ha postulado que la ciclofilina A es el donador de los electrones (65). Se ha visto que las Prx participan en la protección de las proteínas y lípidos al generarse un estrés oxidativo, en la proliferación y diferenciación celular y en las vías de señalización intracelular que regulan la apoptosis (8, 68, 69).

Se ha observado que las familias de Prx I, II, IV y VI se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células, mientras que las familias III y V se localizan preferentemente en la mitocondria (70, 71).

El mecanismo catalítico propuesto para las peroxirredoxinas I-V es el siguiente (64):



2.3.1 La nefrona.

La nefrona es la unidad funcional del riñón y está constituida por un glómulo y un túbulo, el cual está subdividido en segmento proximal, asa de Henle, túbulo distal y un ducto colector (Figura 4).

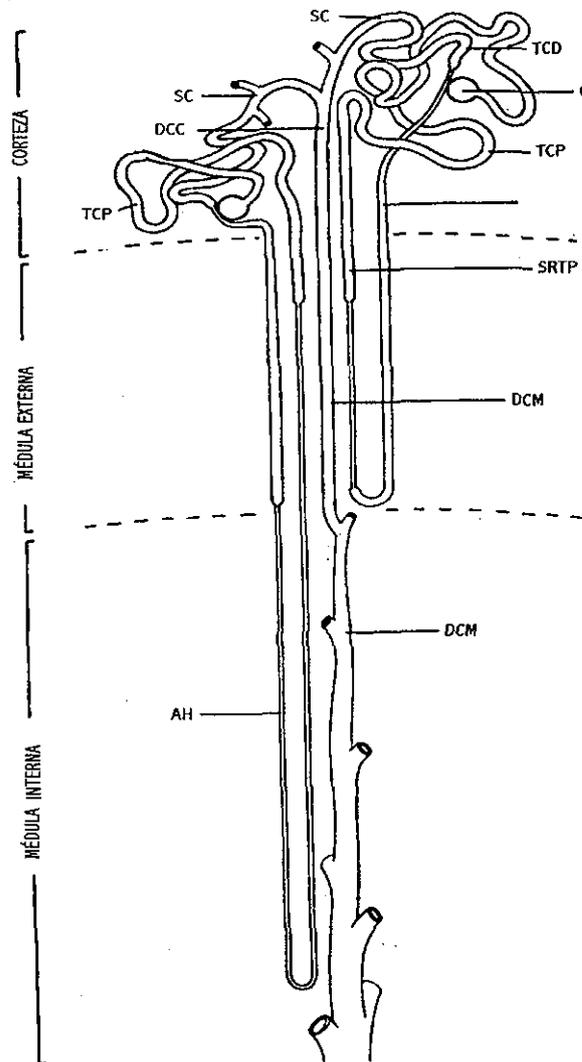


Figura 4: Estructura de la nefrona y su distribución en el riñón. TCP = túbulo contorneado proximal; SRTP = segmento recto del túbulo proximal; DCC = ducto colector cortical; SC = segmento conector; TCD = túbulo contorneado distal; G = glómulo; DCM = ducto colector medular; AH = asa de Henle. Fuente (73).

El glómulo está constituido por una red de vasos capilares (los cuales tienen su origen en la arteriola aferente) la cual está rodeada de una invaginación denominada cápsula de Bowman; al espacio que hay entre el conjunto de vasos capilares y la cápsula de Bowman se le conoce como espacio de Bowman, el cual recibe el filtrado glomerular (Figura 5). Los vasos capilares están constituidos por dos capas de células (endoteliales y viscerales) las cuales están separadas por la membrana basal glomerular. Las células endoteliales forman la barrera inicial para el paso de metabolitos transportados en la sangre hacia el espacio de Bowman, debido a que la superficie de estas células está cargada

negativamente por la presencia de glucoproteínas polianiónicas tales como las sialoproteínas. Debido a la presencia de las sialoproteínas, la filtración es mayor para las sustancias catiónicas que para las neutras y las cargadas negativamente.

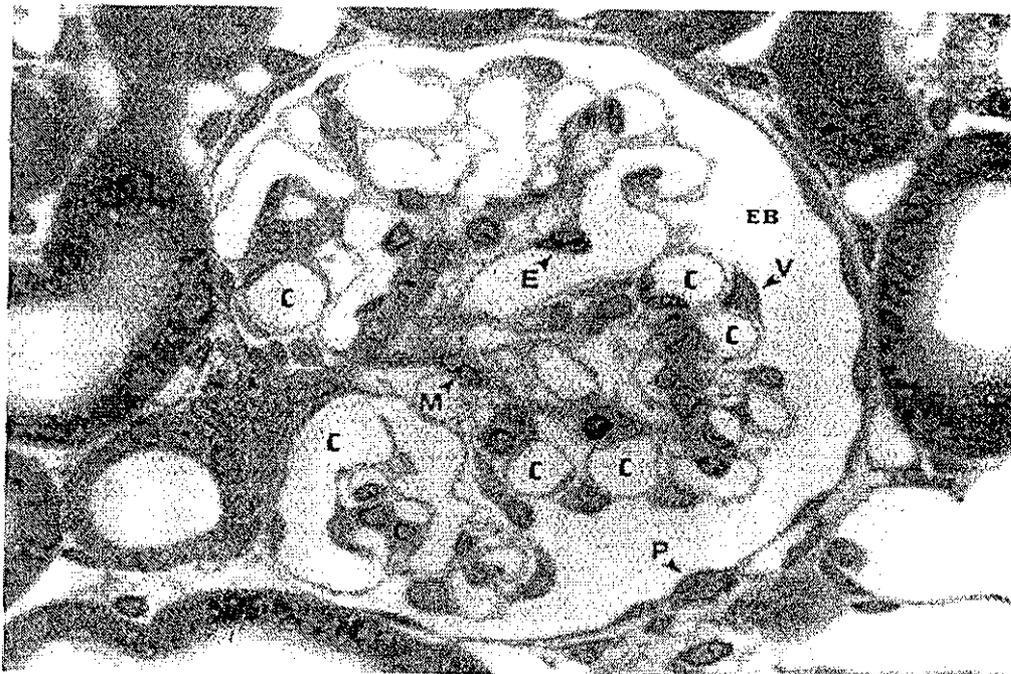


Figura 5: Micrografía de luz de un glomérulo de rata normal y donde se muestran los principales componentes celulares: M = células mesangiales; E = células endoteliales; V = células epiteliales viscerales; P = células que revisten la cápsula de Bowman; EB = espacio de Bowman. Fuente (73).

Estructuralmente, las células endoteliales están fenestradas, el diámetro de cada fenestra o poro oscila entre 70 y 100 nm. Las células epiteliales viscerales, también llamadas podocitos, poseen prolongaciones citoplásmicas que recubren una gran área de la superficie de la membrana basal glomerular. Así como las células endoteliales, los podocitos también poseen en su superficie membranal glucoproteínas polianiónicas. Se cree que la carga negativa en la superficie de las células endoteliales y viscerales es importante para el mantenimiento de la estructura y función de la barrera de filtración.

Otro tipo celular muy importante en el glomérulo lo constituyen las células mesangiales. Estas células se caracterizan por tener prolongaciones citoplásmicas que pueden extenderse alrededor del lumen capilar así como alrededor de la membrana basal glomerular. El citoplasma de las células mesangiales posee un extenso arreglo de microfilamentos, compuestos de actina, α -actina y miosina, el cual está encaminado a modular la dilatación capilar.

En lo que respecta a los túbulos, la sección que comienza en el polo del glomérulo se le conoce como túbulo contorneado proximal, el cual alcanza una longitud de aproximadamente de 8 mm en ratas y 14 mm en humanos y su diámetro es de aproximadamente 40 μm . Las células epiteliales que recubren la membrana basal tubular se caracterizan por tener microvellosidades en el lado apical de las células y se le denomina membrana de borde en cepillo. Las invaginaciones de la membrana de borde en cepillo incrementan 36 veces la superficie luminal (74). Es en esta sección de la nefrona donde se lleva a cabo la reabsorción de la mayoría de las moléculas indispensables para el organismo (glucosa, aminoácidos, agua, proteínas de bajo peso molecular, iones como Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , etc) (72, 73). Diversos estudios indican la presencia de un aparato endocítico-lisosomal en la base de las microvellosidades, el cual está involucrado en los procesos de reabsorción y degradación de macromoléculas. Por otro lado, la reabsorción de metabolitos de bajo peso molecular está acoplado al transporte activo del sodio por parte de las ATPasas de sodio-potasio y bombas de sodio las cuales se encuentran en la parte basolateral de las células. Es importante señalar que en los túbulos proximales se sintetiza la mayor parte de la enzima glutatión peroxidasa plasmática circulante, enzima que es utilizada como marcador de daño a esta estructura de la nefrona (75).

2.4 INSUFICIENCIA RENAL AGUDA (IRA)

La IRA es una enfermedad que se caracteriza por una disminución abrupta de la filtración glomerular, lo que da por resultado la acumulación en el organismo de productos finales del metabolismo, como por ejemplo los compuestos nitrogenados tales como urea y creatinina. La insuficiencia renal aguda es particularmente asintomática y se detecta cuando a individuos se les realiza un perfil bioquímico, detectándose un incremento en los niveles de nitrógeno de urea y creatinina en plasma. Una característica frecuente de esta enfermedad la constituye la oliguria.

La IRA se divide en tres fases:

- 1) Fase de iniciación: es el período donde el daño al parénquima renal empieza a evolucionar y puede durar horas o días.
- 2) Fase de mantenimiento: es el período donde el daño al parénquima renal está ya establecido, la tasa de eliminación de orina generalmente es la más baja en este período. Una oliguria severa, así como una prolongada fase de mantenimiento están asociadas con una recuperación lenta.
- 3) Fase de recuperación: es el período donde los individuos recobran la función renal a través de procesos de reparación y regeneración del tejido renal.

Los cambios morfológicos en la IRA se dividen en tres fases: la primera se caracteriza por una disminución de las áreas apicales y laterales de las células y la membrana en borde en cepillo puede

disminuir y desaparecer, desprenderse de la superficie apical, o bien, puede internalizarse y aparecer en vacuolas. La segunda fase se caracteriza por la muerte de las células y/o descamamiento de las mismas, las cuales se acumulan en el lumen de los túbulos promoviendo obstrucción de los mismos. La tercera fase se caracteriza porque las células sobrevivientes proliferan rápidamente y su aspecto es aplanado e hipercromático (73).

La IRA puede producirse como consecuencia de una alteración, ya sea en el proceso de ultrafiltración de la sangre que llega a los glomérulos, en los procesos de reabsorción y secreción (que finaliza con la conducción de la orina por las vías urinarias hacia el exterior), o bien, por insuficiencia en la perfusión renal. Es importante mencionar que la necrosis tubular aguda (NTA) es la causa más común que origina una IRA. La NTA generalmente es causada por isquemia o diferentes agentes como antibióticos, anestésicos, medios de contraste, venenos, inmunosupresores, solventes orgánicos y metales pesados (76-79). La NTA se caracteriza por la generación de una serie de alteraciones estructurales y moleculares de las células tubulares, tales como aparición de especies reactivas de oxígeno (80, 81), pérdida del borde en cepillo, disminución o desaparición de los procesos de absorción y excreción, aparición de hipoxia, incremento de calcio citosólico, disfunción mitocondrial, descenso en los niveles de ATP y ADP, aumento de AMP, acidosis intracelular y abultamiento de las células epiteliales, que, junto con restos necróticos de estas células, contribuye a la obstrucción tubular (73, 76).

Estudios recientes sugieren que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad (24, 72, 82, 83); por ejemplo, en la NTA se ha visto que la generación de las ERO puede inducir la síntesis de compuestos vasoconstrictores como por ejemplo la endotelina-1. Esto puede incrementar la resistencia arteriolar o bien promover la contracción del mesangio, lo que trae como consecuencia una disminución en el proceso de filtración glomerular (84). La inducción de vasoconstrictores por las ERO ha sido reportada en varios modelos de NTA inducida por factores tóxicos como ciclosporina, glicerol, cisplatino y gentamicina (85). Por otro lado, se ha visto que las ERO son capaces de generar la peroxidación de los lípidos de membrana alterando la fluidez membranal. También pueden modificar la estructura y, por consiguiente, la actividad de proteínas debido a alteraciones en los residuos de aminoácidos como es el caso de la oxidación de grupos sulfhidrilos. Por ejemplo, al generarse un estrés oxidativo con FeCl_3 en membranas parcialmente purificadas provenientes de médula externa de riñón de cerdo, la ATP-asa de sodio/potasio mostró una disminución en su actividad y un incremento en la formación de sulfhidrilos y hubo un incremento en la peroxidación de las membranas lipídicas (86). Por otro lado, se ha observado que las ERO son capaces

de desestabilizar las proteínas del citoesqueleto así como a las integrinas, las cuales facilitan la unión a la matriz extracelular (87).

Debido a que se ha encontrado que las ERO se generan en los modelos de IRA por NTA, se han llevado a cabo estudios con el propósito de dilucidar el grado de participación de estas en la generación del daño en esta enfermedad. Por ejemplo, estudios realizados en modelos experimentales de IRA por NTA, en donde se ha visto que al suministrarse compuestos antioxidantes, como es el caso del piruvato (compuesto que tiene la capacidad de degradar peróxido de hidrógeno mediante una reacción de descarboxilación), a animales con IRA inducida por t-butilhidroperóxido, la alteración en la actividad de proteínas de membrana como la ATPasa de sodio/potasio es significativamente menor que en aquellos animales expuestos únicamente al agente oxidante (88). Otros compuestos antioxidantes como la riboflavina son capaces de disminuir los efectos nefrotóxicos causados por el cromato (89). En el modelo de IRA inducida por gentamicina se ha visto que la adición de ajo en la dieta de ratas tratadas, el cual posee propiedades antioxidantes intrínsecas, reduce el daño en los túbulos proximales en comparación con las tratadas con gentamicina únicamente (90).

Por otro lado, se ha visto que en modelos de IRA, hay modificaciones en la cantidad y actividad de algunas enzimas antioxidantes. Por ejemplo, en el modelo de isquemia reperusión, las enzimas antioxidantes CAT, GPX y SOD disminuyen su actividad, cantidad de proteína y niveles de ARNm, por lo que se sugiere que las ERO juegan un papel importante en la regulación de la expresión del sistema enzimático renal (91). También se ha observado en el modelo de isquemia la disminución en actividad de las enzimas SOD y GPX (92, 93). Por otro lado, en el modelo de IRA por gentamicina se observó una disminución en la actividad de las enzimas CAT, SOD y GPX (90, 94). En estudios realizados *in vitro* empleando células renales de embrión de humano, estas fueron sometidas a un estrés oxidativo inducido con cisplatino y se observó que las células que sobreexpresaron a la enzima SOD fueron menos sensibles que aquellas que no fueron transfectadas (95).

2.5 DICROMATO DE POTASIO

El dicromato de potasio es un compuesto cuya fórmula química es $K_2Cr_2O_7$, es altamente corrosivo y es capaz de provocar ulceraciones en la piel, destrucción de las membranas de la mucosa nasal, etc. Sin embargo, a pesar de su alta peligrosidad, es ampliamente utilizado en la industria fotográfica, calzado, pintura, eléctrica, etc. (96).

El dicromato de potasio en solución se disocia generando por un lado iones K^+ y por otro iones cromato o dicromato, siendo el pH un factor importante en la generación de uno u otro tipo de ión; si la solución es ácida se favorece la formación de anión dicromato y por otro lado, si la solución es básica

se forma el anión cromato. Tanto en el anión dicromato como en el cromato, el catión metálico central tiene un estado de valencia (VI). (Figura 6).

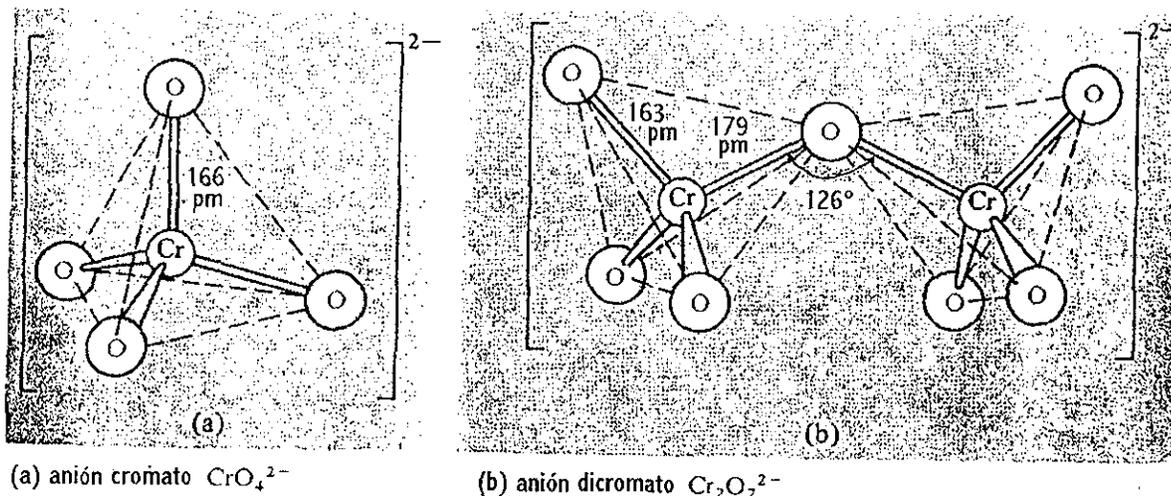


Figura 6: Estructura molecular de los iones cromato y dicromato. Fuente: (97).

En condiciones fisiológicas, el dicromato de potasio se disocia en iones potasio y cromato (CrO_4^{2-}); este último tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares con relativa facilidad por acción de un sistema de transporte aniónico para fosfatos y sulfatos (98, 100). También se ha observado que la vida media del Cr(VI) en plasma es de 39 horas (99). Se ha visto que uno de los principales órganos afectados por este compuesto es el riñón, provocando en este órgano NTA (79, 100-104).

2.5.1 Necrosis tubular aguda mediada por dicromato de potasio.

Se ha demostrado que al administrar dicromato de potasio a ratas en dosis únicas de 20 mg/kg de peso, este tóxico es capaz de provocar alteraciones al riñón, afectando particularmente a las células del túbulo proximal, ocasionando en estas células la pérdida de la membrana de borde en cepillo; además, provoca que las células se hinchen reduciendo el lumen tubular (100, 101, 105), también induce glicosuria, proteinuria y poliuria (106). Se ha observado que en el riñón, el contenido de este nefrotóxico alcanza un valor máximo a las 6 horas de exposición y después declina a la mitad del valor máximo a las 48 horas (que es el tiempo donde se observa el mayor daño estructural) (107).

El dicromato de potasio, de una manera no muy clara, afecta a los transportadores de glucosa en la membrana de borde en cepillo (108). Asimismo, la presencia en orina de proteínas características de las células del túbulo proximal es un indicativo de alteraciones en las membranas plasmáticas de

estas células. Entre estas proteínas podemos citar a la N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (105), glutamina transaminasa, γ -glutamyltransferasa, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa (109).

Por otro lado, en otros estudios se demostró que la aplicación de una dosis única de dicromato de potasio (15 mg/kg) a ratas, indujo un aumento en los niveles de urea en sangre (NUS) y de creatinina. Asimismo, con ayuda del microscopio electrónico, se determinó que las células epiteliales del túbulo proximal presentaron un aumento en el número de vacuolas y lisosomas, y se observó que las mitocondrias presentaban alteraciones estructurales en las crestas (105).

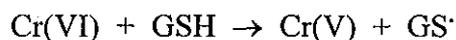
Con el análisis de rayos X se detectó en las células del túbulo proximal la presencia de Cr(VI) en vacuolas autolíticas, caracterizadas por la presencia de la enzima fosfatasa ácida. Este tipo de vacuolas no se observan en las células normales, no así en las células dañadas donde se les puede observar a menudo (96). Por su parte, Sharma *et.al* (110) demostraron que el dicromato de potasio es capaz de provocar, además de necrosis tubular, hemólisis intravascular, la cual puede acelerar el proceso de necrosis y por lo tanto agravar la insuficiencia renal.

2.5.2 Participación de las especies reactivas de oxígeno en la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio.

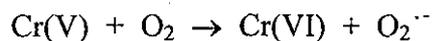
Se ha visto que los aniones cromato una vez que penetran en las células, son reducidos por enzimas como la citocromo P450 y por moléculas reductoras como el glutatión y el ácido ascórbico, generándose intermediarios reactivos de cromo así como algunos radicales (100). En los intermediarios de cromo reactivos generados, el catión metálico central (Cr) adquiere diferentes estados de valencia y entre los más comunes tenemos al Cr(V), Cr(IV) y Cr(III) (111, 112, 102). Se ha establecido que el Cr(VI) (anión cromato) es más tóxico que el Cr(III), por ejemplo, se demostró que en riñón, a una dosis de 20 mg/kg de peso solamente la forma hexavalente fue capaz de causar lipoperoxidación en el riñón (113-115). En algunos estudios realizados en el riñón se detectó la presencia de lipoperoxidos, tales como el malondialdehído (116) (compuesto generado por la oxidación de las membranas celulares), lo cual sugirió que el daño ocasionado por el dicromato de potasio a este órgano fue provocado por ERO. Lo anterior ha sido apoyado por una serie de experimentos en los cuales al administrar compuestos antioxidantes tales como melatonina (116), vitamina E y vitamina C, el grado de lipoperoxidación en el riñón, así como los niveles de urea en la sangre disminuyeron (117, 118).

Se han llevado a cabo estudios en los cuales se ha tratado de dilucidar el mecanismo mediante el cual el dicromato de potasio puede generar a las ERO, en especial al radical hidroxilo. Se ha demostrado que, en presencia de GPX y de NADPH, el Cr(VI) se reduce a Cr(V) ($\text{Cr}(\text{O}_2)_4^{3-}$) generando

radicales hidroxilo (119, 120). Otros estudios indican que el Cr(VI) puede interactuar con grupos tioles como por ejemplo el del glutatión (107, 114, 121-123), produciéndose el intermediario Cr(V):



el cual es capaz de reducir al oxígeno molecular generando un anión superóxido (124):



el que a su vez es reducido por la acción de la enzima SOD, o bien por el proceso de dismutación se produce peróxido de hidrógeno, que al interactuar con el Cr(V) mediante una reacción tipo Fenton se produce la ruptura de la molécula de peróxido de hidrógeno generándose el radical hidroxilo (102, 125, 126):



Algunos estudios *in vitro* sugieren que de la reacción anterior puede generarse, además de radicales hidroxilo, singulete de oxígeno con la participación de algunas moléculas de agua (127, 128). También se ha observado que en el proceso de generación de anión superóxido, los niveles de óxido nítrico disminuyen como consecuencia de la interacción del anión superóxido con el óxido nítrico para dar como resultado la formación de peroxinitrito (129).

Xie y Zhuang (120) observaron que, en cultivos celulares, la generación de radicales hidroxilo en células tratadas con Cr(VI) está involucrada en el daño de la membrana plasmática y de los organelos como las mitocondrias, donde se promueve la disipación del potencial de membrana, lo que trae como consecuencia su disfunción.

En animales expuestos al efecto nocivo del cromato, se ha observado que el Cr(V) induce una disminución de los niveles de glutatión y de glutatión reductasa. Se ha postulado que los posibles sitios de reducción del Cr(VI) son los microsomas y las mitocondrias con la participación de H₂O₂, ácido ascórbico y GSH. También se ha observado que al reaccionar el anión cromato con el glutatión se puede formar Cr(III), sin embargo, se ha determinado que este compuesto es inocuo (114).

Ahora bien, los radicales hidroxilo generados son capaces de alterar las membranas de las células y de los organelos, debido a que pueden reaccionar directamente con los fosfolípidos oxidando los ácidos grasos poliinsaturados y, por consiguiente, generando lipoperóxidos (130, 131). Tomando en consideración la capacidad del dicromato de potasio de provocar alteraciones en la función renal y dar origen a la IRA, principalmente por la acción nociva de las ERO generadas en el proceso de reducción de este compuesto, la exposición de animales de laboratorio a este nefrotóxico ha sido empleado como modelo experimental para estudiar la fisiopatología de esta enfermedad (132, 133).

2.5.3 Enzimas antioxidantes en la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio.

El comportamiento del sistema enzimático antioxidante en la nefrotoxicidad inducida por el dicromato de potasio se ha explorado muy poco. El único estudio realizado al respecto indica que enzimas antioxidantes tales como la CAT, GPX y SOD son susceptibles de ser modificadas en su actividad. En el estudio realizado por Sengupta *et al.* (134) se encontró que a dosis de 1500 mg/kg por día de dicromato de potasio vía intragástrica, hay una disminución abrupta en la actividad de las enzimas antes mencionadas. Sin embargo, al llevar a cabo el mismo experimento, pero con dosis de 300 mg/kg por día, se observó un ligero aumento en la actividad de dichas enzimas. Sin embargo, en este estudio no se demostró la inducción de la IRA.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las ERO participan de manera importante en el desarrollo de la IRA en humanos y en modelos experimentales. El tratamiento de ratas con dicromato de potasio es un modelo experimental usado para estudiar la fisiopatología de esta enfermedad en donde hay evidencias de que la generación de ERO participa en el daño renal. Sin embargo no se han realizado estudios sistemáticos para valorar la posible participación del sistema antioxidante enzimático en la fisiopatología de esta enfermedad. Por ejemplo no se conoce como responden las enzimas SOD, GPX, GR, CAT, TRx y las Prx, ni se sabe si esta respuesta es homogénea entre éstas enzimas antioxidantes y si sus posibles alteraciones guardan relación con las alteraciones funcionales y estructurales características de la IRA por dicromato de potasio.

2.5.3 Enzimas antioxidantes en la nefrotoxicidad inducida por dicromato de potasio.

El comportamiento del sistema enzimático antioxidante en la nefrotoxicidad inducida por el dicromato de potasio se ha explorado muy poco. El único estudio realizado al respecto indica que enzimas antioxidantes tales como la CAT, GPX y SOD son susceptibles de ser modificadas en su actividad. En el estudio realizado por Sengupta *et al.* (134) se encontró que a dosis de 1500 mg/kg por día de dicromato de potasio vía intragástrica, hay una disminución abrupta en la actividad de las enzimas antes mencionadas. Sin embargo, al llevar a cabo el mismo experimento, pero con dosis de 300 mg/kg por día, se observó un ligero aumento en la actividad de dichas enzimas. Sin embargo, en este estudio no se demostró la inducción de la IRA.

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las ERO participan de manera importante en el desarrollo de la IRA en humanos y en modelos experimentales. El tratamiento de ratas con dicromato de potasio es un modelo experimental usado para estudiar la fisiopatología de esta enfermedad en donde hay evidencias de que la generación de ERO participa en el daño renal. Sin embargo no se han realizado estudios sistemáticos para valorar la posible participación del sistema antioxidante enzimático en la fisiopatología de esta enfermedad. Por ejemplo no se conoce como responden las enzimas SOD, GPX, GR, CAT, TRx y las Prx, ni se sabe si esta respuesta es homogénea entre éstas enzimas antioxidantes y si sus posibles alteraciones guardan relación con las alteraciones funcionales y estructurales características de la IRA por dicromato de potasio.

4. HIPÓTESIS

Es probable que el estrés oxidativo generado por dicromato de potasio induzca un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX, GR, TRx y Prx en la corteza renal de ratas tratadas con este compuesto con el propósito de contrarrestar dicho daño.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar en un curso temporal la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX, GR, TRx y Prx en la corteza renal de ratas con IRA inducida por dicromato de potasio.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

En un estudio cronológico de ratas control y tratadas con dicromato de potasio evaluar:

- 1) El grado de IRA.
- 2) El estrés oxidativo.
- 3) La actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX GR, TRx y Prx en la corteza renal.

4. HIPÓTESIS

Es probable que el estrés oxidativo generado por dicromato de potasio induzca un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX, GR, TRx y Prx en la corteza renal de ratas tratadas con este compuesto con el propósito de contrarrestar dicho daño.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar en un curso temporal la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX, GR, TRx y Prx en la corteza renal de ratas con IRA inducida por dicromato de potasio.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

En un estudio cronológico de ratas control y tratadas con dicromato de potasio evaluar:

- 1) El grado de IRA.
- 2) El estrés oxidativo.
- 3) La actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX GR, TRx y Prx en la corteza renal.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 REACTIVOS

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., EUA): tritón X-100, xantina, xantina oxidasa, nitroazul de tetrazolio (NBT), dietilditiocarbamato (DDC), bolsas de diálisis, NADPH, glutatión reductasa, glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), p-nitrofenil- β -D-glucosamínido, P-nitrofenol, reactivo de Ellman (DTNB), tioredoxina, tioredoxina reductasa, reactivo de folín, leupeptina, pepstatina, aprotinina, azul de bromofenol, glicina, archilamida, N,N'-metileno-bis-acrilamida, tris-HCl, glicerol, mercaptoetanol, persulfato de amonio, temed, 3,3'-diaminobencidina, albúmina sérica bovina y el anticuerpo anti-Trx. El peróxido de hidrógeno y el tartrato de sodio se obtuvieron de Mallinckrodt Chemicals Co. (Paris, Kentucky). La aurotioglucosa y el ácido nítrico de alta pureza se obtuvieron de Fluka Chemie. Para la medición del nitrógeno de urea en plasma así como de creatinina se utilizaron estuches comerciales de la casa Spinreact. El anticuerpo anti-catalasa se obtuvo de Calbiochem (San. Diego CA., EUA). Los anticuerpos anti-SODCuZn y anti-SODMn se obtuvieron de StressGen Biotechnologies Co. (Canadá). El anticuerpo anti-nitrotirosina se obtuvo de Upstate cell signaling research (Charlottesville, VA. EUA). El anticuerpo secundario anti-conejo y el sistema avidina peroxidasa se obtuvo de Vector Laboratories (Burlingame, CA. EUA). Los siguientes reactivos fueron obtenidos de JT Baker: KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , EDTANa_2 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 y HNO_3 . Para el revelado de las bandas del Western blot se utilizó un estuche de quimioluminiscencia de Amersham Life Science (Buckinghamshire, England).

6.2 ANIMALES

Para la realización de este proyecto, se emplearon ratas macho Wistar de 200-250 gramos de peso las cuales se obtuvieron y se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Química UNAM-HARLAN.

6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

La insuficiencia renal aguda se indujo con una inyección única subcutánea de dicromato de potasio a una dosis de 15 mg/kg de peso. A los grupos control se les aplicó una inyección subcutánea de solución salina (NaCl 0.9%) (101). Las ratas se colocaron en cajas metabólicas para la recolección de orina de 24 horas. El acceso a agua y alimento fue libre en el caso de los grupos tratados con dicromato de potasio, y para los grupos controles el alimento suministrado fue el mismo que el consumido por las ratas tratadas con dicromato de potasio correspondientes. Los animales controles y tratados con dicromato de potasio se sacrificaron a los días 1, 2, 3, 4 y 6.

6.4 MÉTODOS

6.4.1 Determinación de cromo en plasma y en riñón.

Para la determinación de cromo, los riñones se secaron a una temperatura de 100°C hasta alcanzar un peso constante y posteriormente se sometieron a digestión orgánica de la siguiente manera: El riñón completo se colocó en frascos de teflón de 50 ml y se agregaron 4 ml de ácido nítrico de alta pureza y 2 ml de peróxido de hidrógeno. La digestión se realizó en un digestor de microondas (modelo mls 1200 mega de Milestone, Microwave, Laboratory Systems) con el siguiente programa que es una modificación del original recomendado por el manual del equipo:

SECUENCIA	1º PASO	2º PASO	3º PASO	4º PASO	5º PASO
Potencia	250 watts	0 watts	250 watts	400 watts	400 watts
Tiempo	1 min	1 min	8 min	5 min	5 min

La solución obtenida se aforó a 10 ml con agua destilada y posteriormente se guardó en recipientes de polietileno. Para la determinación de cromo en plasma no se requirió del proceso de digestión.

La determinación de cromo de las muestras preparadas de riñón y de plasma de ratas controles y tratadas con dicromato de potasio se llevó a cabo por espectrometría de absorción atómica, empleando para ello un equipo de horno de grafito Perkin/Elmer 3100 HGA-600 con automuestreador AS-60 y recirculador de agua. Las muestras digeridas, así como el plasma se diluyeron en agua destilada y desionizada. Se procedió a realizar una mezcla, la cual consistió en 20 µl de muestra diluida, 5 µl de nitrato de magnesio al 5% y 5 µl del modificador de matriz. Se colocó la mezcla en tubos polirrecubiertos de plataforma. El programa utilizado para la lectura de las muestras fue el siguiente:

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO RAMPA (seg)	DE TIEMPO SOSTENIDO (seg)	FLUJO INTERNO DE GAS ARGÓN (mg/min)
1	120	10	50	300
2	1650	1	30	300
3	20	1	15	300
4	2500	0	5	0
5	2600	1	5	300

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La detección de cromo se determinó a una longitud de onda de 357 nm y a una abertura de haz de luz de 0.7 nm. Esta determinación se realizó en el laboratorio de la Doctora Liliana Saldivar del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM.

6.4.2 Evaluación del daño renal.

6.4.2.1 Evaluación de la función glomerular.

Para la medición del nitrógeno de urea en plasma se empleó un estuche comercial el cual se basa en la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, a amonio y CO₂ por medio de la ureasa. En la reacción el α -cetoglutarato es convertido a L-glutamato por la acción de la glutamato deshidrogenasa, la cual emplea como cofactor al NADH presente en el medio y al amonio producido por la ureasa. Los niveles de NADH se midieron espectrofotométricamente a 340 nm, la disminución de NADH es inversamente proporcional a los niveles de urea. Los datos se expresaron como nitrógeno de urea/dL de plasma.

La creatinina presente en plasma y en orina se determinó por medio de la reacción de Jaffé. Este procedimiento se basa en que la creatinina forma un complejo con el picrato (2, 4, 6 trinitrofenol) en un medio alcalino, el producto formado absorbe a 520 nm, por consiguiente la absorbencia del complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina.

6.4.2.2) Evaluación del daño tubular.

6.4.2.2.1) Evaluación funcional del daño en el túbulo proximal.

a) La actividad en orina de la enzima NAG fue medida como marcador de daño, tomando en consideración que esta enzima se encuentra en los lisosomas de las células de los túbulos contorneados proximales y cuando estas células se dañan la enzima se vierte al lumen tubular para después aparecer en la orina. El método utilizado se basa en el empleo de p-nitrofenil N-acetil-beta-glucosamínido como sustrato de la enzima, de la reacción se libera el compuesto p-nitrofenol, el cual se midió espectrofotométricamente a 450 nm (105, 135).

b) La cantidad de proteínas en orina se determinó por un método turbidimétrico mediante el empleo de ácido tricloroacético (90). Cuando hay daño en las células de los túbulos contorneados proximales disminuye la reabsorción de proteínas y estas por consiguiente aparecen en la orina (90).

c) La actividad de la GPX plasmática se determinó utilizando el mismo método que se emplea para determinar la actividad de la glutatión peroxidasa citosólica, solo que en este caso se utilizaron 0.1 ml de plasma diluido previamente, en una proporción de 1:8 en lugar del homogenizado de riñón (90).

Esta enzima es sintetizada casi exclusivamente en las células de los túbulos contorneados proximales (57, 75) y por consiguiente cuando estas células se dañan, disminuye la capacidad para sintetizarla, lo que trae como consecuencia que su concentración en el plasma disminuya.

6.4.2.2.2 Evaluación estructural del daño tubular.

Se obtuvieron muestras de riñón para el análisis histológico. Las muestras se fijaron en 1 ml de formaldehído al 10% en amortiguador PBS, posteriormente se deshidrataron en alcohol absoluto (tres horas) para después pasarlas a xilol (tres horas) y finalmente los tejidos se sumergieron en parafina a 60°C (tres horas), al término de este procedimiento las muestras de riñón se colocaron en moldes con parafina líquida para la obtención de bloques sólidos. Se realizaron cortes de 4 micras y se montaron en portaobjetos (preparaciones histológicas) destinados, por un lado, para la tinción con eosina/hematoxilina (H&E) para la determinación del daño generado por el dicromato de potasio, o bien para la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

La cuantificación del daño se realizó empleando un analizador de imágenes Leica Qwin (Cambridge, England). De cada grupo experimental se analizaron un promedio de 700 túbulos, procediendo posteriormente a obtener los porcentajes de túbulos sanos, dañados (parciales y/o totales) y en regeneración.

6.4.3 Valoración del estrés oxidativo mediante la localización inmunohistoquímica de nitrotirosina.

Para la determinación del estrés oxidativo en la corteza renal se procedió a realizar cortes de cuatro micras de los riñones en bloques de parafina, los cuales se montaron en portaobjetos recubiertos con 3-aminopropiltriethoxisilano, procediendo a desparafinar, hidratar, inhibir a la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (15 ml) y metanol (85 ml), para después incubar toda la noche empleando para ello un anticuerpo anti-nitrotirosina diluido 1:400 en albúmina al 1% en PBS. Este anticuerpo reconoce residuos de nitrotirosinas generadas por un exceso en la producción de peroxinitritos, el cual a su vez es generado por un exceso de anión superóxido y óxido nítrico. Para la detección antígeno-anticuerpo se empleó un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vectastain) diluido 1:500 en albúmina al 1% en PBS, incubándose 1 hora, posteriormente se incubaron con el sistema avidina-peroxidasa por 1 hora, finalmente se realizó el proceso de revelado incubando las muestras con una solución de diaminobenzidina (2.7 mM) y peróxido de hidrógeno (353 mM) en PBS. La especificidad de la inmunotinción se determinó con el empleo de albúmina al 1% en PBS en lugar del anticuerpo primario. En estos controles negativos no se observó tinción. Todas las incubaciones realizadas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Después de la inmunotinción, las preparaciones histológicas se contrastaron con la solución de hematoxilina de Harris. Las fotomicrografías mostradas son representativas de cada grupo de animales tratados con dicromato de potasio.

6.4.4 Determinación de las actividades de las enzimas antioxidantes.

Para la determinación de las actividades enzimáticas se procedió a homogenizar los tejidos en una proporción de 1:10 (peso/volumen) en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y tritón x-100 al 1%. Las actividades de las enzimas se expresaron por miligramo de proteína. La concentración de proteína en las muestras se midió por el método de Lowry et al.

6.4.4.1 Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

La determinación de SOD total se llevó a cabo aplicando el método de azul de nitrotetrazolio (NBT) (136). El método se basa en que la enzima SOD disminuye la reducción del NBT por iones superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. El NBT reducido se leyó a 560 nm. Los datos se expresaron como U de SOD/mg de proteína. Una unidad de SOD está definida como la cantidad de SOD necesaria para inhibir la reducción del NBT en un 50%.

6.4.4.2 Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPX).

La actividad enzimática de la glutatión peroxidasa se llevó a cabo mediante el método de Paglia y Valentine (137). Este método se basa en la oxidación del NADPH exógeno por la enzima glutatión reductasa la cual regenera al glutatión reducido que es el sustrato de la glutatión peroxidasa. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm cada minuto en un período de 5 minutos. Los datos se expresaron en U/mg de proteína, una unidad se define como la cantidad de la enzima que oxida 1 μ mol de NADPH/min.

6.4.4.3 Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR).

Para la determinación de la enzima GR se llevó a cabo el método descrito por Carlberg y Mannervik (138). Este método se basa en la oxidación del NADPH por la enzima GR, la cual reduce al glutatión oxidado exógeno. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm cada minuto en un período de 3 minutos. Los datos se expresaron en U/mg de proteína, una unidad se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH/min.

6.4.4.4 Actividad de catalasa (CAT).

Para la determinación de la actividad catalítica de esta enzima, se empleó el método de Aebi (49), el cual se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno por la CAT. La actividad catalítica de esta enzima se siguió durante un período de 30 segundos, a una longitud de 240 nm, que es el lapso de tiempo en que la descomposición del peróxido de hidrógeno sigue una cinética de primer orden. La actividad se expresó como constante de velocidad k /mg proteína.

6.4.4.5) Actividad de tiorredoxina reductasa (TrxR).

Para la determinación de la actividad reductora de la TrxR se llevó a cabo el método descrito en Hill et al. (139). Se procedió a realizar homogenados de corteza renal en amortiguador PBS (100 mM pH 7.5), el cual se dividió en dos porciones. A la porción 1 (40 μ l) se agregaron 10 μ l de una solución 12.75 mM de aurotioglucosa (en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7) incubándose por espacio de 10 minutos con el objeto de inhibir la actividad de la TrxR. A la porción 2 (40 μ l) se agregaron 10 μ l de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. Tanto a la porción 1 como a la 2 se les agregaron 750 μ l de la siguiente mezcla de reacción: NADPH (0.5 mM) y DTNB (reactivo de Ellman) (2 mM) en amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7. La reacción se leyó a 412 nm durante 4 minutos. La actividad se expresó en nanomoles de DTNB reducido/mg de proteína.

6.4.4.6) Actividad de peroxirredoxinas (Prx).

Para la determinación de la actividad antioxidante de las peroxirredoxinas, se llevó a cabo el método directo descrito en Chae et al. (63), el cual se basa en el hecho de que la reducción del H_2O_2 por peroxirredoxinas (Prx) está acoplada a la oxidación de NADPH vía tiorredoxina (Trx) y tiorredoxina reductasa (TrxR). Brevemente, el método utiliza una mezcla de NADPH 250 μ M, tiorredoxina reductasa 20 nM, tiorredoxina 2 μ M y 0.5 mM de H_2O_2 . La reacción se inicia por la adición de una fuente de Prx (homogenado de corteza renal) y se mide la disminución de la absorbencia a una DO de 340 nm cada minuto en un período de 5 minutos. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, donde una unidad está definida como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NADPH/minuto.

6.4.5) Cantidad de proteína de las enzimas antioxidantes.

Para la determinación por Western blot de la cantidad de proteína de las enzimas, se empleó el siguiente procedimiento:

Se homogenizaron 100 mg de corteza renal en 300 μ l de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4, conteniendo, en una concentración final los siguientes inhibidores de proteasas: leupeptina 5 μ g/ml, pepstatina 7 μ g/ml, aprotinina 5 μ g/ml y EDTA 1 mM. De los homogenados se procedió a medir el contenido de proteínas por el método de Lowry et al. Las proteínas se desnaturalizaron a 95°C por 1 minuto en el siguiente amortiguador: Tris 50 mM, pH 6.8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 3% de mercaptoetanol y 0.1% de azul de bromofenol. La separación de proteínas se realizó a 100 V en geles de poliacrilamida al 12% con un gel de apilamiento al 5% de poliacrilamida y sumergidos en amortiguador de corrida SDS-Tris glicina. Las proteínas fueron transferidas a 400 mA por dos horas a membranas de nitrocelulosa (HybondTM ECLTM nitrocellulose membrana, Amersham, Buckinghamshire, UK) en presencia de un amortiguador de Tris-glicina-SDS, metanol con las siguiente concentraciones 25, 192, 3.5 mM y 20% respectivamente. Se llevó a cabo el procedimiento recomendado por Amersham ECL Western Blotting Protocols para la inmunodetección. Brevemente, las membranas se bloquearon con leche al 5% por 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con los anticuerpos anti-catalasa y anti-SODCuZn y anti-SODMn (diluidos 1:1000) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a una peroxidasa (diluido 1:5000) por una hora a temperatura ambiente. Las bandas se revelaron con películas Kodak con el empleo de las soluciones ECL. Posteriormente el revelado se sometió a un análisis densitométrico con el programa Adobe PhotoDeLuxe.

6.4.6 Localización inmunohistoquímica de las enzimas antioxidantes SODCu/Zn y SODMn, catalasa.

Para llevar a cabo la técnica inmunohistoquímicas para localizar las enzimas antioxidantes, se utilizó el procedimiento empleado en la localización de la nitrotirosina. Las diluciones realizadas a los anticuerpos primarios para detectar SODCu/Zn y SODMn fueron 1:250 y 1:500 respectivamente, para los anticuerpos anti-catalasa y anti-tiorredoxina la dilución realizada fue de 1:500.

6.4.7 Análisis estadístico.

Los datos se analizaron por una ANOVA de dos vías usando el programa Graph Pad Prism. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. Los datos están expresados como media \pm E.E.M

7. RESULTADOS

7.1 PESO CORPORAL, VOLUMEN URINARIO Y CONCENTRACIÓN DE CROMO.

En la Figura 1 se presenta el peso corporal de las ratas a lo largo del estudio. Se observa que no existen diferencias entre los grupos control y tratados a cada tiempo de estudio.

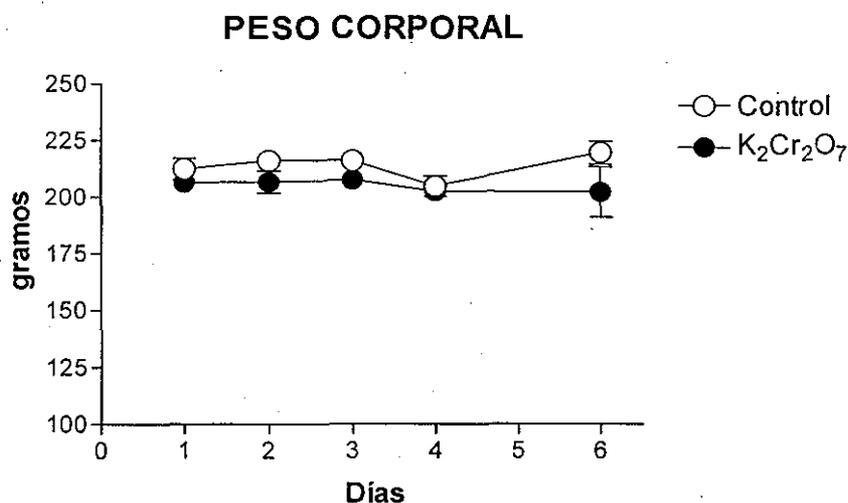


Figura 1. Peso de ratas controles y tratadas con dicromato de potasio. Cada punto es un promedio de 5-8 determinaciones.

Por otro lado, al llevar a cabo el monitoreo diario del volumen urinario, se observó que los animales expuestos a dicromato de potasio presentaron un cuadro de poliuria a partir del tercer día de tratamiento, observando una ligera tendencia a disminuir al final del estudio (Figura 2).

VOLUMEN URINARIO

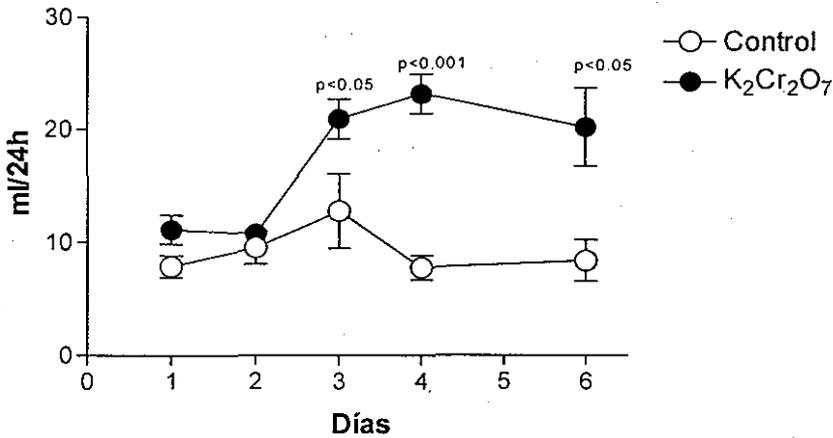


Figura 2. Efecto del dicromato de potasio sobre el volumen urinario. Cada punto es un promedio de 5-7 determinaciones para controles y de 21-23 para tratadas con dicromato de potasio.

La concentración de cromo disminuyó considerablemente en el plasma a lo largo del estudio hasta valores no diferentes del control en el día 6 (Figura 3). Por su parte, los niveles de cromo en el riñón disminuyeron de manera paulatina hasta el cuarto día, manteniéndose elevados hasta el final del estudio (Figura 3).

CONCENTRACIÓN DE CROMO

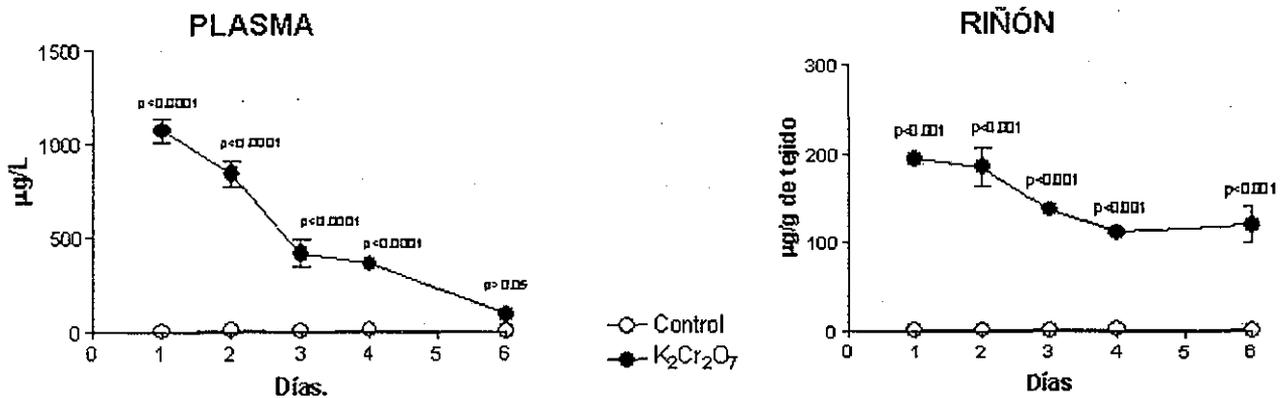


Figura 3. Concentración de cromo en plasma y en riñón en ratas control y en ratas tratadas con dicromato de potasio. El cromo se determinó por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Cada punto es un promedio de 5-9 determinaciones para el caso de cromo en plasma y para el cromo en el riñón es de 5.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7.2 CARACTERIZACIÓN DE LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA.

7.2.1) Parámetros de función glomerular.

En las Figuras 4-6 se presentan los parámetros de función glomerular. Se observa que la creatinina en plasma presenta un aumento máximo en el segundo día, manteniéndose hasta al cuarto día, para después disminuir de manera considerable en el sexto día a valores no diferentes del control (Figura 4). Por su parte, la depuración de creatinina disminuyó del día 2 al día 4 (Figura 5). En el caso del nitrógeno de urea en sangre se alcanzaron los niveles más altos al tercer y cuarto día para después disminuir en el sexto día (Figura 6). Sin embargo su concentración siguió siendo significativamente elevada.

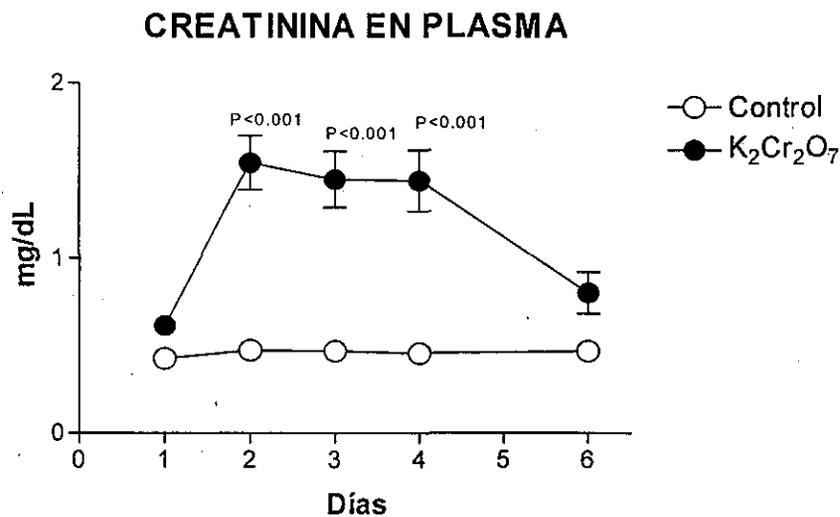


Figura 4. Niveles de creatinina en ratas control y tratadas con dicromato de potasio. Cada punto es un promedio de 5-16 determinaciones.

DEPURACIÓN DE CREATININA

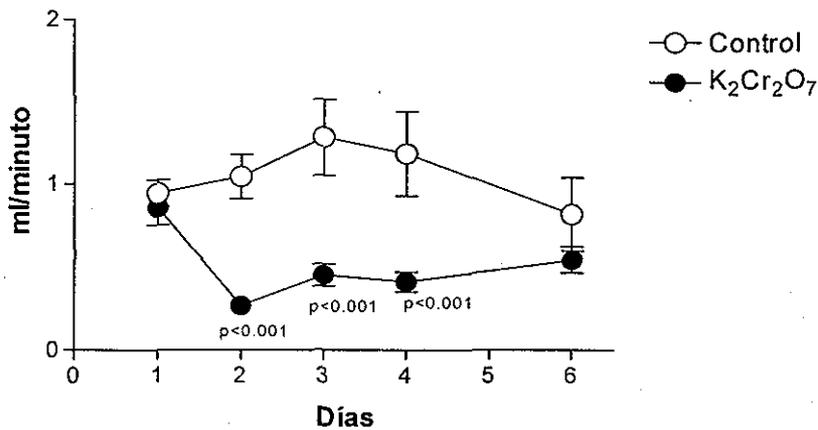


Figura 5. Efecto del dicromato de potasio sobre la depuración de creatinina. Cada punto es un promedio de 5-16 determinaciones.

NUS

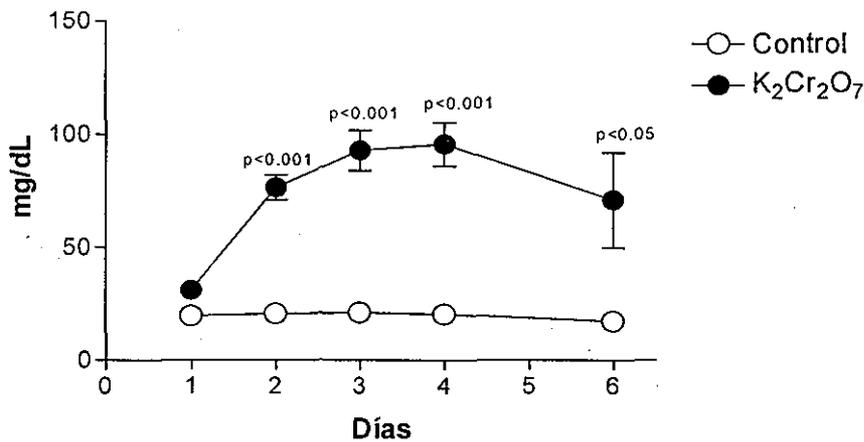


Figura 6. Efecto del dicromato de potasio sobre la concentración del nitrógeno de urea en sangre. Cada punto es un promedio de 5-22 determinaciones.

7.2.2 Parámetros para evaluar la función tubular.

En las figuras 7-9 se presentan los parámetros de función tubular. La actividad de la enzima NAG alcanza su valor más alto al segundo día, para después disminuir progresivamente hasta alcanzar valores normales al final del estudio (Figura 7). Por su parte, la presencia de proteínas en orina se incrementó drásticamente en el primer día de tratamiento, alcanzando su punto más alto al segundo día, para después disminuir paulatinamente hasta el final del estudio (Figura 8). En lo que se refiere a la

actividad de la enzima glutatión peroxidasa plasmática, ésta alcanzó sus niveles mínimos al segundo día, permaneciendo constantes hasta el final del estudio (Figura 9).

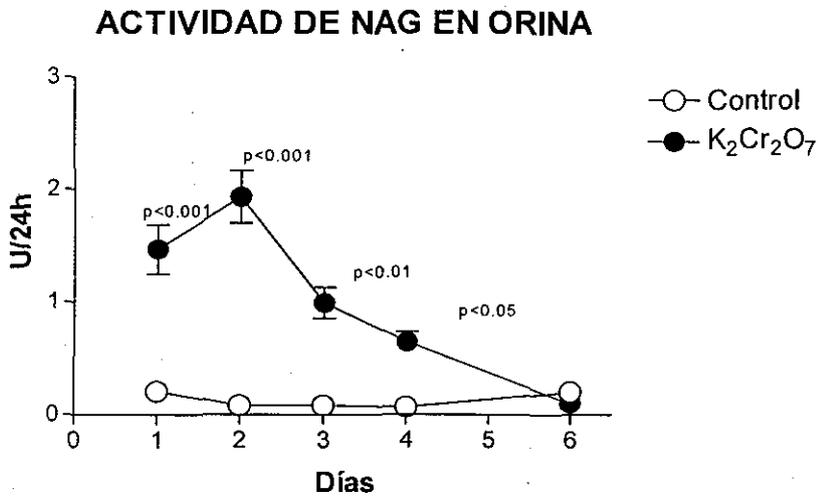


Figura 7. Actividad de la enzima lisosomal NAG en orina de ratas control y tratadas con dicromato de potasio. Cada punto es un promedio de 4-19 determinaciones.

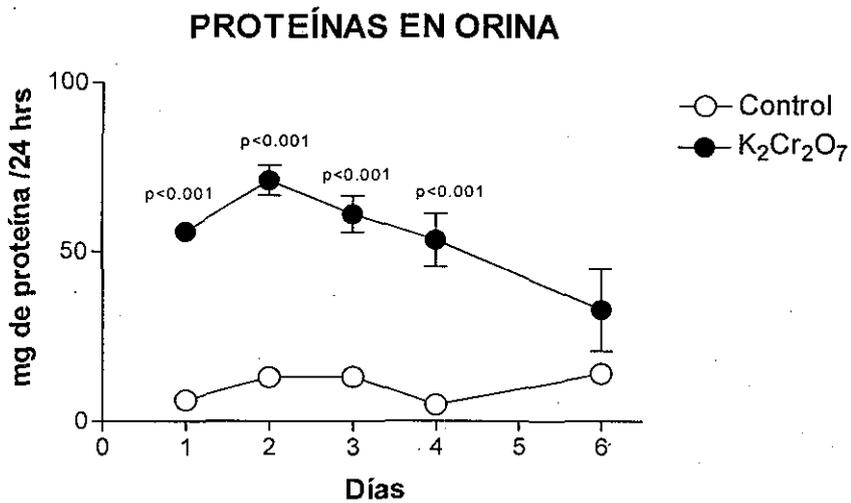


Figura 8. Excreción de proteínas en orina en ratas control y tratadas con dicromato de potasio. Cada punto es un promedio de 5-49 determinaciones.

ACTIVIDAD DE GPX PLASMÁTICA

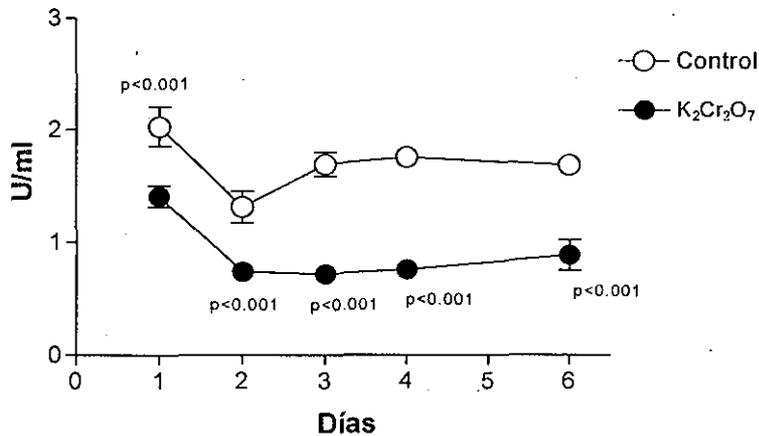


Figura 9. Efecto del dicromato de potasio sobre la actividad de la glutatión peroxidasa plasmática. Cada punto es un promedio de 5-12 determinaciones.

7.2.3 Daño histológico.

En la figura 10 se muestran imágenes histológicas representativas del daño morfológico en la corteza renal producido por la administración de dicromato de potasio. En la Figura 10a se muestra la estructura histológica de un animal del grupo control. Un día después de la administración de dicromato de potasio, existe vacuolación de la mayoría de las células que revisten los túbulos contorneados proximales (flechas), y el epitelio de los túbulos distales y glomerulares no muestran alteraciones (Figura 10b). Dos días después de la administración de dicromato de potasio, se observa que el epitelio de los túbulos contorneados proximales presentan necrosis extensa caracterizada por acidofilia y fragmentación citoplásmica, así como condensación y disolución nuclear (flechas) (Figura 10c). Tres días después de la administración de dicromato de potasio, las células necróticas de la mayoría de los túbulos contorneados proximales ocupan la totalidad de los lúmenes (asteriscos); algunos túbulos contorneados proximales muestran actividad regenerativa caracterizada por células con núcleos grandes e hiperromáticos con citoplasma escaso y basófilo (flechas) (Figura 10d). Al cuarto día de la administración de dicromato de potasio, la mayoría de los túbulos contorneados proximales muestran células en regeneración aún con detritus celulares acumulados en sus lúmenes (flechas) (Figura 10e). Por último, seis días después de la administración de dicromato de potasio, casi la totalidad de los túbulos contorneados proximales han sido reconstituidos por células regenerativas en estadio moderadamente avanzado de maduración y algunos túbulos muestran escasos detritus en sus lúmenes (Figura 10f).

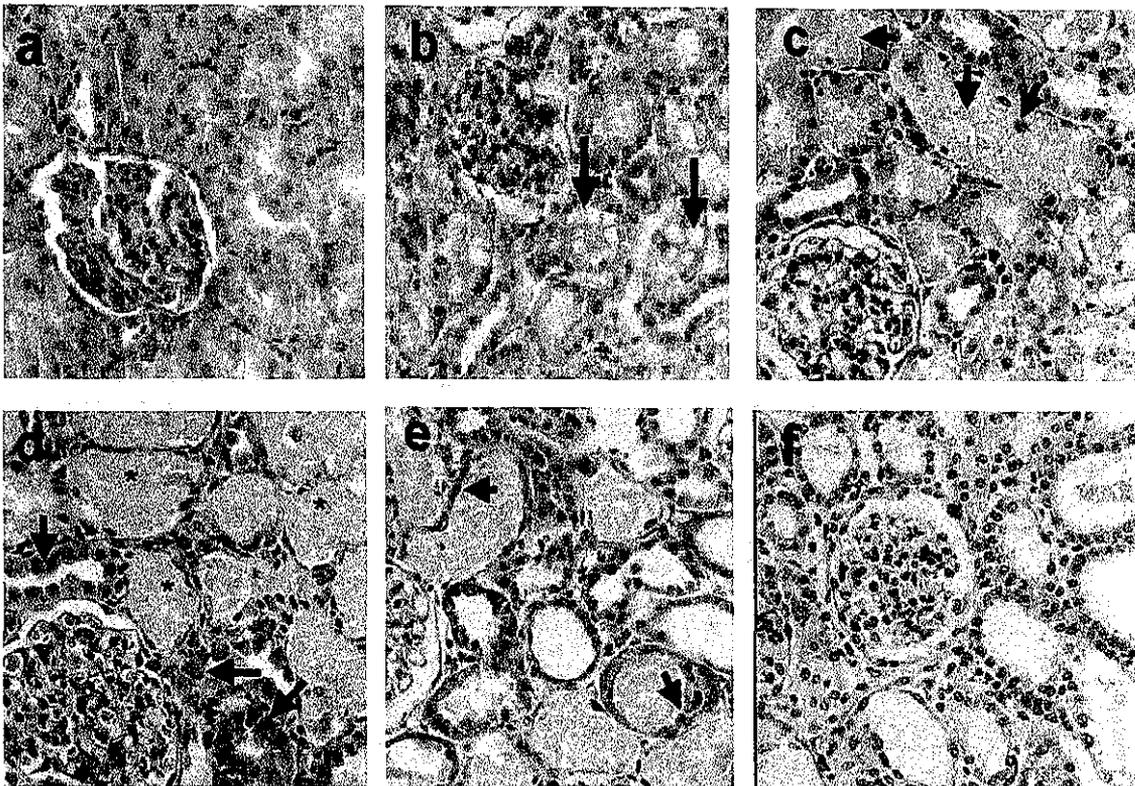


Figura 10: Imágenes histológicas representativas donde se muestran las características del daño generado por el dicromato de potasio en los días 1, 2, 3, 4 y 6 (a, b, c, d, e y f, respectivamente). La figura 10a muestra la corteza renal de una rata sin tratamiento (control). En la figura 10b se observa la presencia de vacuolas en las células dañadas (flechas). En las figuras 10c-e se observa la presencia de túbulos hialinos (asteriscos) así como de túbulos en proceso de regeneración flechas (figuras 10c-f). H&E. (a-f) 200x.

En la tabla 1 y figura 11 se presentan datos cuantitativos de los grupos tratados con dicromato de potasio y en donde se observa que en el primer día de exposición, aproximadamente un 52% del total de túbulos proximales presentaron daño. Al segundo día de exposición, el daño fue mayor y por consiguiente el porcentaje de túbulos dañados se incrementó a un 62%, asimismo el análisis histológico reveló que el porcentaje de túbulos en proceso de regeneración fue de aproximadamente un 10%. En relación al tercer día de exposición al tóxico, se observó que el porcentaje de túbulos en regeneración se incrementó hasta en un 35%, mientras que el porcentaje de túbulos dañados disminuyó hasta un 43%. En lo que respecta al cuarto día de exposición al tóxico, el porcentaje de túbulos en regeneración se incrementó hasta un 50%, mientras que el de túbulos dañados disminuyó hasta en un 28%, también se observó que el número de túbulos hialinos comenzó a disminuir. Finalmente en el sexto día de exposición al dicromato de potasio, el proceso de regeneración se encontró en un estado avanzado, caracterizado por la disminución en el porcentaje de túbulos dañados (10%), así como el incremento en túbulos en regeneración fue de aproximadamente 75%.

Tabla 1: Porcentaje de túbulos normales, en regeneración y dañados en toda la corteza renal en las ratas tratadas con dicromato de potasio (15 mg/Kg, s.c.).

Tiempo Días	% túbulos dañados	% túbulos en regeneración	% túbulos normales	# túbulos	# ratas
1	52	0	48	708	5
2	62	10	28	657	5
3	43	35	22	883	5
4	28	50	22	837	5
6	10	75	15	1057	7

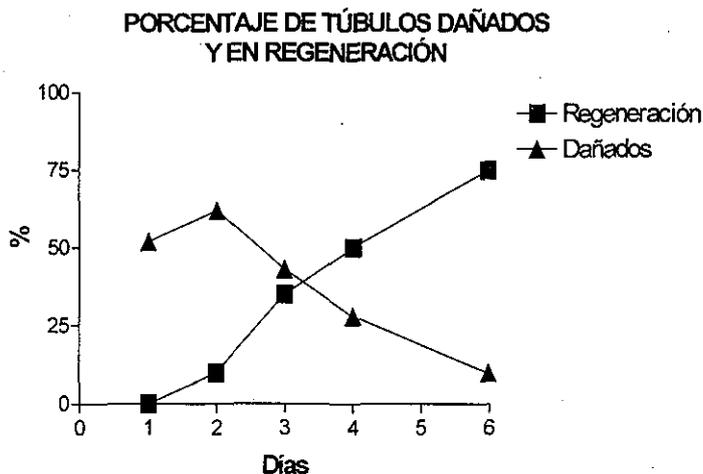


Figura 11. Porcentaje de túbulos en regeneración y dañados de ratas tratadas con dicromato de potasio a lo largo del periodo de estudio. El análisis se realizó empleando un analizador Leika Qwin. Cada punto es un promedio de 5 ó 7 preparaciones histológicas por grupo de ratas expuestas a dicromato de potasio.

7.3 DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La determinación del estrés oxidativo se llevó a cabo con la detección de residuos de nitrotirosina en proteínas, empleando para ello un anticuerpo que reconoce estos residuos de aminoácidos modificados. En la figura 12 se muestran imágenes histológicas representativas de la corteza renal de animales tratados con dicromato de potasio y sometidos a técnicas inmunohistoquímicas para la detección de nitrotirosina. En la figura 12a se muestra un riñón de rata sin tratamiento, el cual no muestra inmunotinción. Un día después de la administración de dicromato de potasio, la mayoría de las células vacuoladas que revisten a los túbulos contorneados proximales muestran inmunorreactividad positiva caracterizada por una coloración café claro (flechas) (figura 12b). Dos días después de la administración del dicromato de potasio, se observó una intensa

inmunorreactividad citoplásmica en las células necróticas que revisten los túbulos contorneados proximales (figura 12c). En relación al tercer día después de la administración del dicromato de potasio, la inmunorreactividad para nitrotirosina se encuentra exclusivamente en las células necróticas epiteliales de algunos túbulos contorneados proximales (flechas); las células epiteliales en regeneración son negativas (cabeza de flechas) (figura 12d). Al cuarto día postratamiento, la mayoría de las células que revisten los túbulos contorneados proximales son células en regeneración sin inmunorreactividad a la nitrotirosina (flechas) (figura 12e). Al sexto día posterior al tratamiento con dicromato de potasio, se observa que algunos túbulos contorneados proximales que están revestidos por células regeneradas muestran ligera tinción positiva (flechas), mientras que otras son totalmente negativas (cabeza de flechas) (figura 12f).

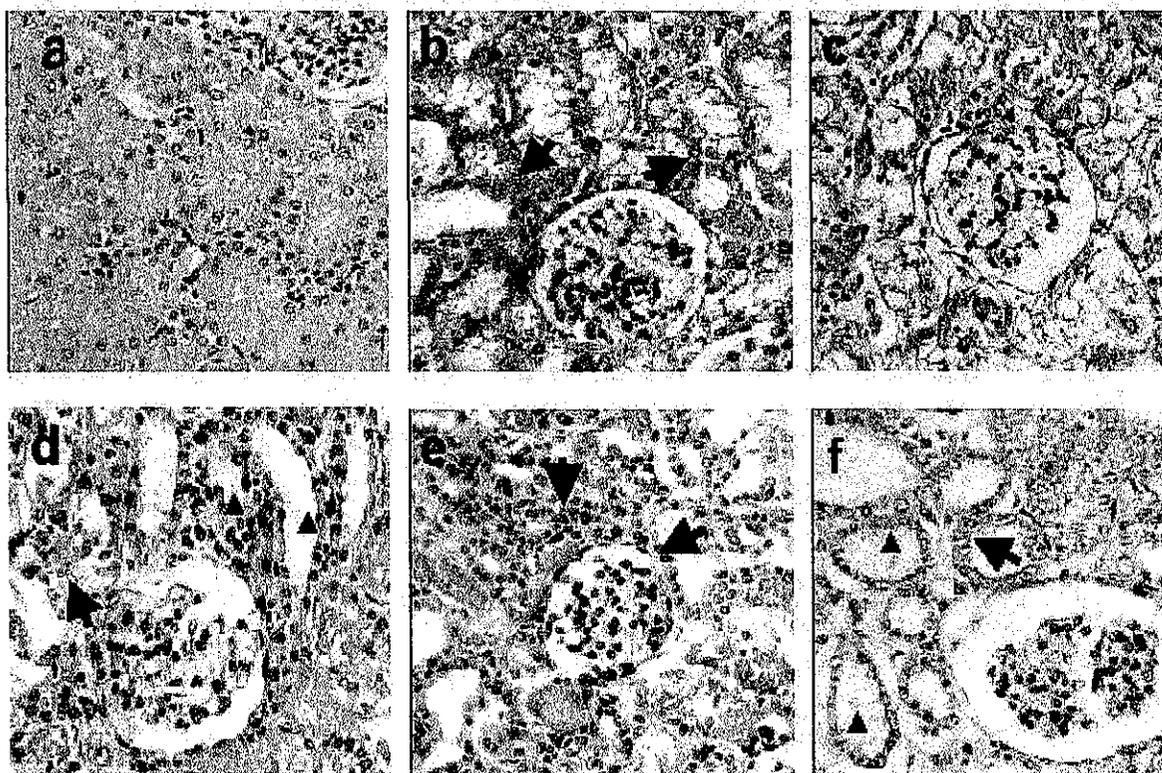


Figura 12: Inmunohistoquímica de nitrotirosina en riñón de rata control y de ratas expuestas a dicromato de potasio 1, 2, 3, 4 y 6 días (b, c, d, e y f, respectivamente).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

7.4.1) Superóxido dismutasa.

En las figura 13 se muestra la actividad de la enzima antioxidante SOD total (la suma de las actividades de las isoformas de SODCu/Zn y SODMn), la cual no se modificó significativamente a lo largo del estudio, aunque hubo una ligera tendencia a disminuir hacia el final.

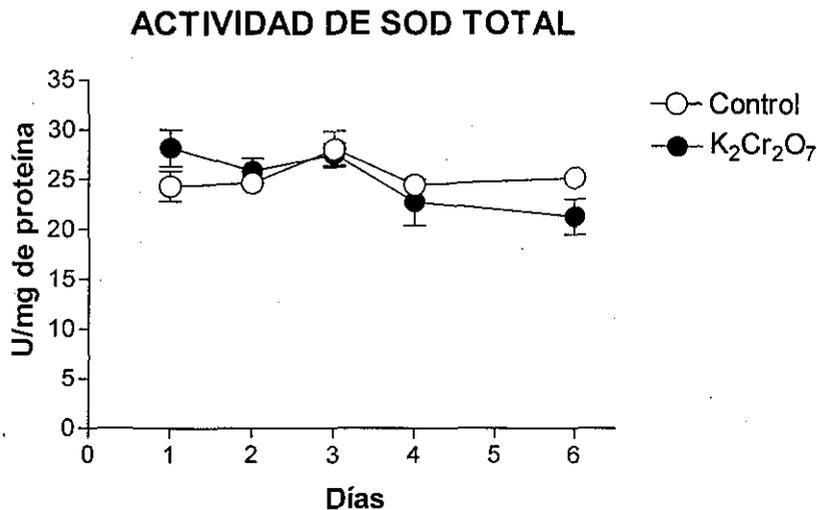


Figura 13. Actividad de SOD total en corteza renal de ratas control y tratadas con dicromato de potasio. Cada punto es un promedio de 5-22 determinaciones. (P= NS)

En lo que respecta a la cantidad de la enzima SOD, el Western blot realizado para cada una de las isoformas indica que, para SODCuZn no hay cambios durante el período de estudio (Figura 14 y 15), mientras que para la isoforma SODMn se observa una leve disminución en el día 6 (Figura 16) la cual es significativa de acuerdo con el análisis estadístico de los datos densitométricos (Figura 17).

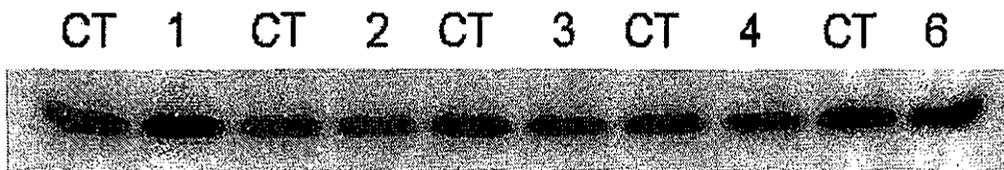


Figura 14: Imagen representativa de 4 Western blot de SODCuZn realizados, donde 1, 2, 3, 4 y 6 corresponden a los días de tratamiento con dicromato de potasio y CT a su correspondiente control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

WESTERN BLOT DE SODCuZn

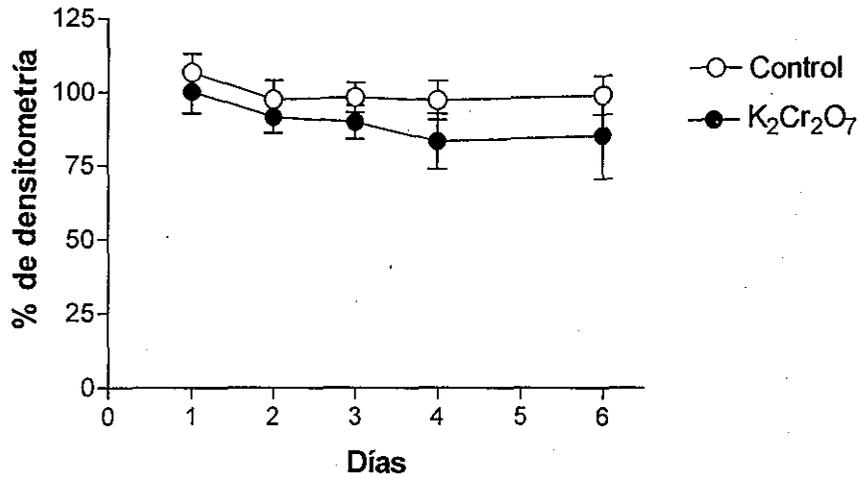


Figura 15: Análisis densitométrico del Western blot de SODCuZn. Cada punto es un promedio de 4 determinaciones. (P= NS)

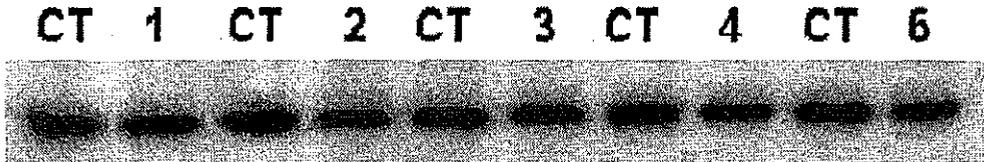
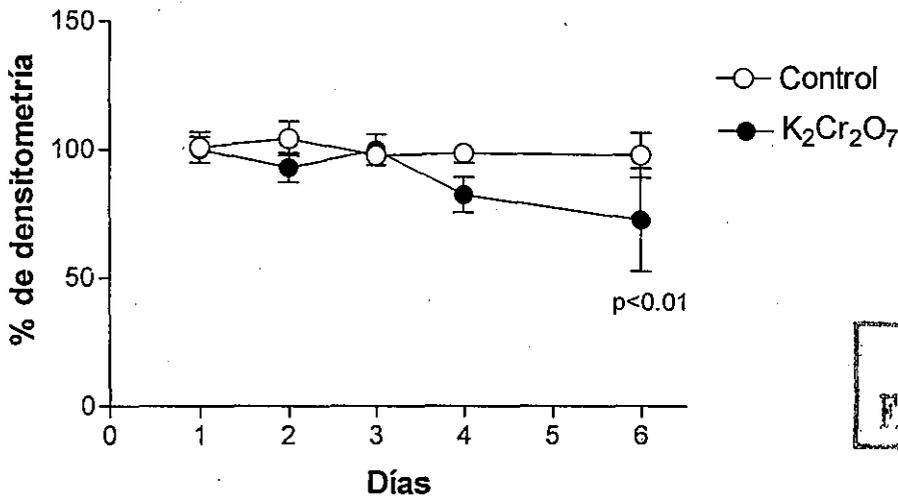


Figura 16: Imagen representativa de 4 Western blot de SODMn realizados, donde 1, 2, 3, 4 y 6 corresponden a los días de tratamiento con dicromato de potasio y CT a su correspondiente control.

WESTERN BLOT DE SODMn



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 17: Análisis densitométrico del Western blot de SODMn. Cada punto es un promedio de 4 determinaciones.

Para determinar la distribución de la enzima en la corteza renal durante el período de estudio, se procedió a realizar dos estudios inmunohistoquímicos, empleando anticuerpos que reconocen a las isoformas de la enzima: SODCu/Zn y SODMn.

En la figura 14 se observan imágenes representativas de la detección por inmunohistoquímica de la enzima SODCu/Zn en la corteza renal de ratas normales y tratadas con dicromato de potasio. El riñón de rata normal muestra inmunorreactividad específicamente en el epitelio que reviste a los túbulos contorneados proximales (figura 18a). Los túbulos contorneados proximales en animales después del primer día de tratamiento con dicromato de potasio muestran inmunorreactividad positiva aún en células que muestran vacuolación extensa (figura 18b). Después del segundo y tercer día de tratamiento existe lesión extensa en los túbulos contorneados proximales, caracterizados por y ruptura de membranas apicales; incluso en células con este grado de lesión hay inmunorreactividad positiva (flechas). En el tercer y cuarto día, algunos túbulos muestran actividad regenerativa del epitelio con inmunotinción para la enzima SODCu/Zn (cabeza de flechas), por su lado, los restos necróticos también presentan inmunoreactividad (figuras 18d-e). Finalmente, al sexto día donde el tejido está completamente regenerado se observó inmunotinción para la enzima SODCu/Zn (cabeza de flechas) (Figura 18f).

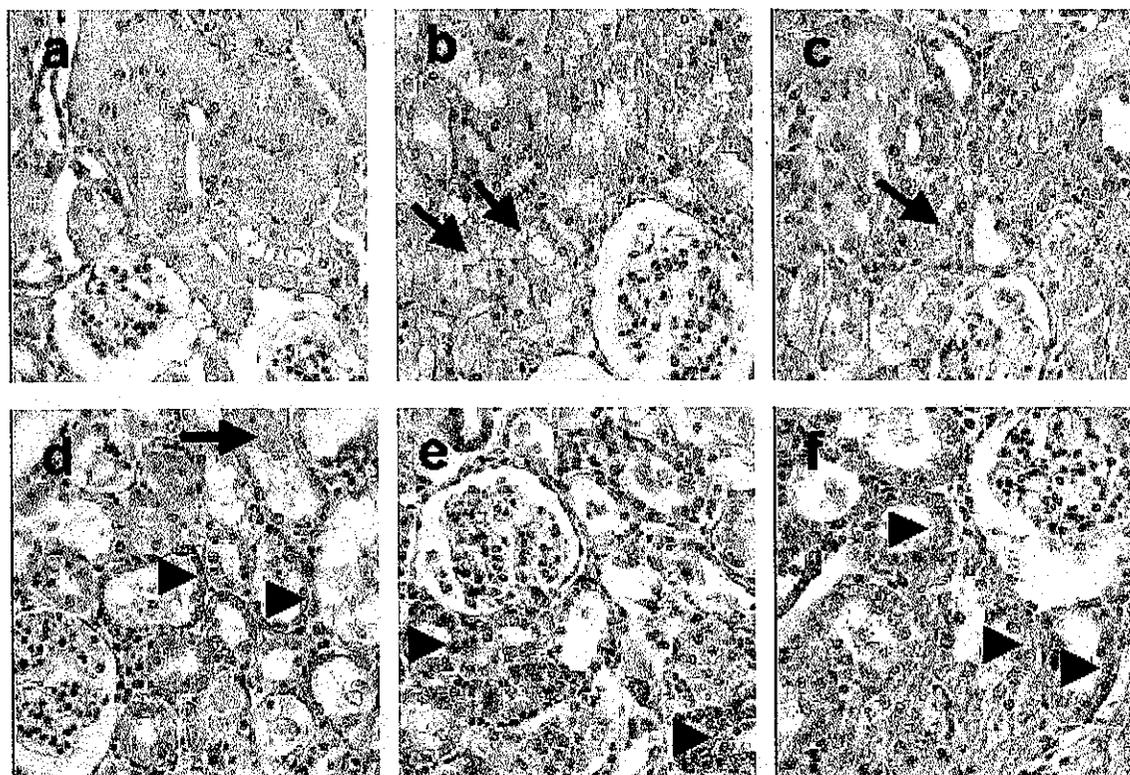


Figura 18: Inmunohistoquímica de CuZnSOD en riñón de rata control y de ratas expuestas a dicromato de potasio 1, 2, 3, 4, 6 días (b, c, d, e y f respectivamente).

En relación a la isoforma de SODMn, se observó un comportamiento similar a la isoforma dependiente de Cu/Zn, donde la presencia de la enzima no disminuye a pesar del daño. La figura 19a muestra la corteza renal de una rata control sin tratamiento, en donde los túbulos contorneados proximales muestran intensa inmunotinción de aspecto granular y localizada específicamente en la base de las células. El primer día posterior a la administración del tóxico, el epitelio tubular muestra vacuolación citoplásmica pero con conservación de la inmunorreacción para SODMn (Figura 19b). En lo que respecta al segundo y tercer día posteriores a la administración del dicromato de potasio (Figura 19c-d), existen múltiples túbulos revestidos de células con lesión avanzada manifestada por vacuolación extrema y/o por células necróticas desprendidas y ubicadas en el lumen de los túbulos. En ambos tipos de células se mantiene la inmunoreactividad para SODMn (flechas); algunos túbulos están ya revestidos por células regeneradas las cuales muestran también inmunoreactividad. Al cuarto día la mayoría de los túbulos revestidos por células regeneradas muestran intensa inmunotinción (flechas); en lo que respecta a las células necróticas, éstas también muestran intensa inmunoreactividad (cabezas de flechas). Finalmente en el sexto día, casi la totalidad de los túbulos contorneados proximales han sido regenerados y las células epiteliales tienen intensa inmunoreactividad a SODMn. No se observaron cambios en la inmunotinción para esta isoforma.

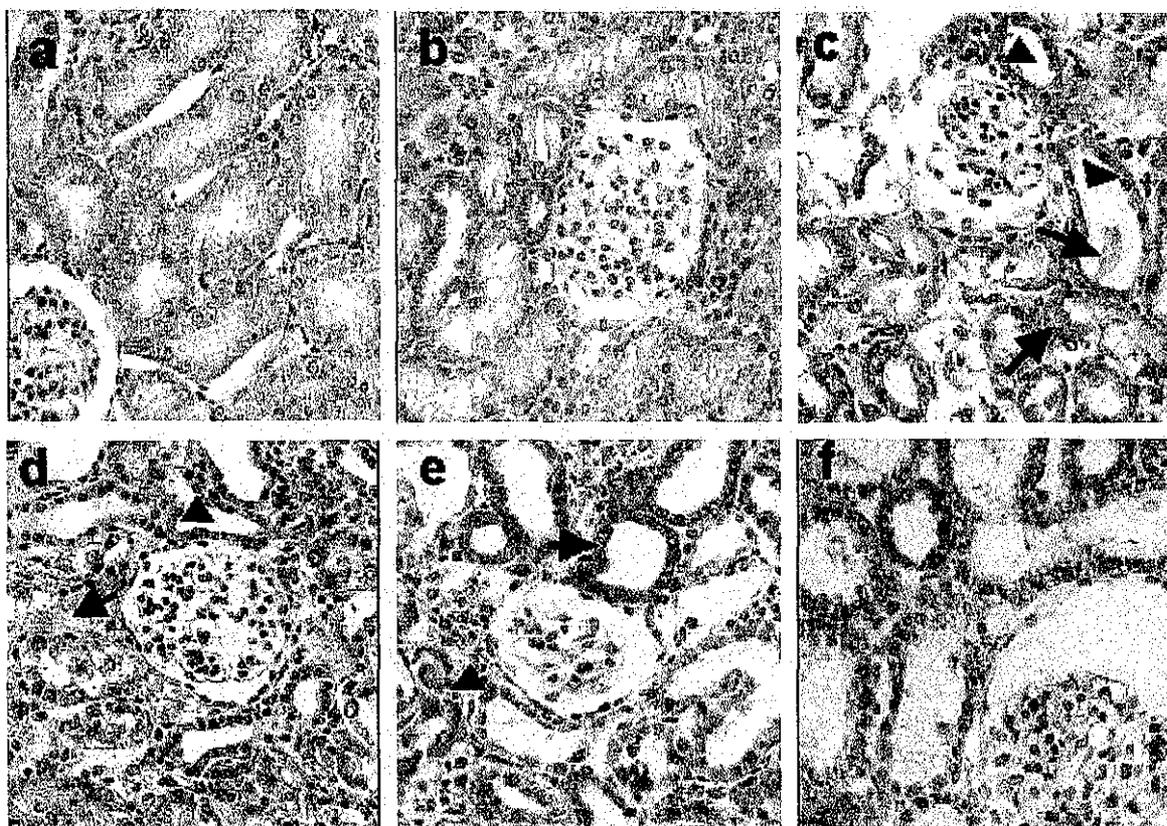


Figura 19: Inmunohistoquímica de SODMn en riñón de rata control y de ratas expuestas a dicromato de potasio 1, 2, 3, 4 y 6 días (b, c, d, e y f respectivamente).

7.4.2 Glutación peroxidasa y glutatión reductasa.

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa citosólica disminuyó significativamente después del cuarto día (Figura 20).

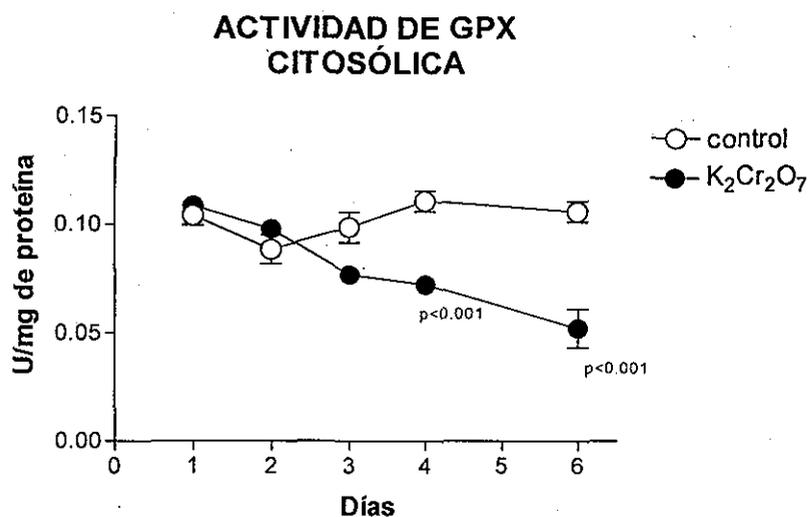


Figura 20. Actividad de glutatión peroxidasa citosólica en corteza renal. Cada punto es un promedio de 5-22 determinaciones.

En relación a la actividad de la enzima glutatión reductasa, se observó una disminución gradual significativa a partir del segundo día posterior al tratamiento hasta el final del tratamiento (Figura 21).

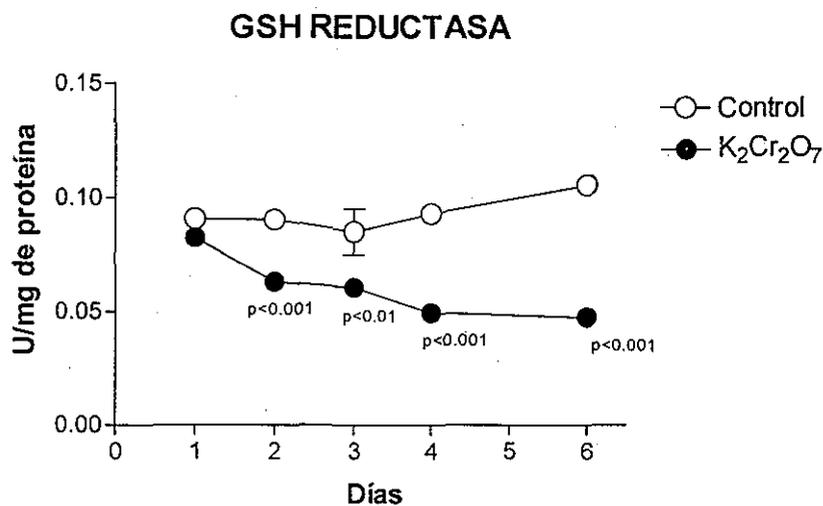


Figura 21: Actividad de glutatión reductasa en corteza renal. Cada punto es un promedio de 3-6 determinaciones.

7.4.3 Catalasa.

La actividad de la enzima catalasa disminuyó a partir del segundo día, alcanzando un valor mínimo al final del estudio (Figura 22).

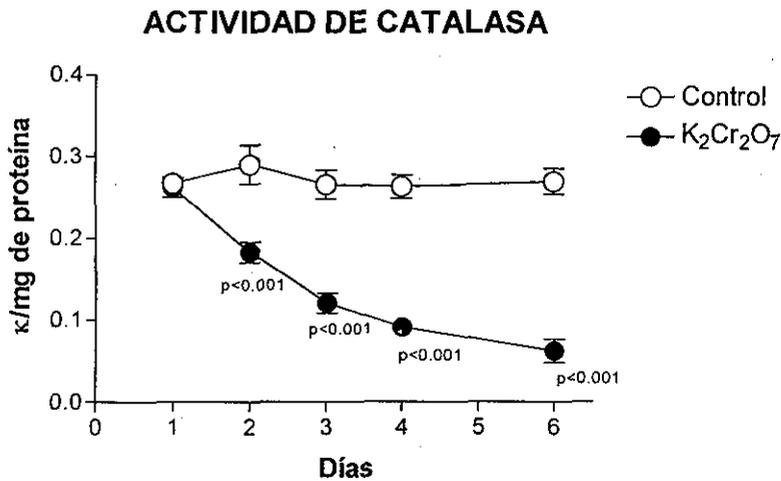


Figura 22. Actividad de catalasa en corteza renal. Cada punto es un promedio de 6-22 determinaciones.

En lo que respecta a la cantidad de la enzima catalasa medida por Western blot, se observa que la cantidad de proteína disminuye a partir del segundo día hasta el final del estudio (figura 23). El análisis estadístico de los datos densitométricos indica que la catalasa disminuye a partir del día 2 (Figura 24).

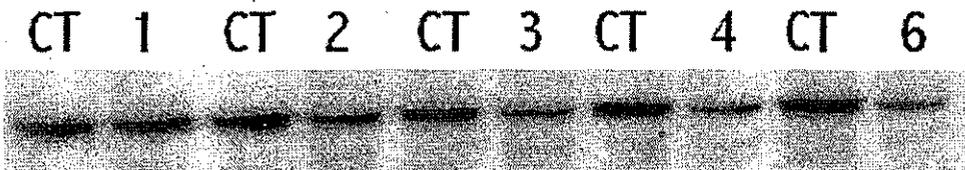


Figura 23: Imagen representativa de 4 Western blot de catalasa realizados, donde CT= control y 1,2,3,4 y 6 corresponden a los días de tratamiento con dicromato de potasio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

WESTERN BLOT DE CATALASA

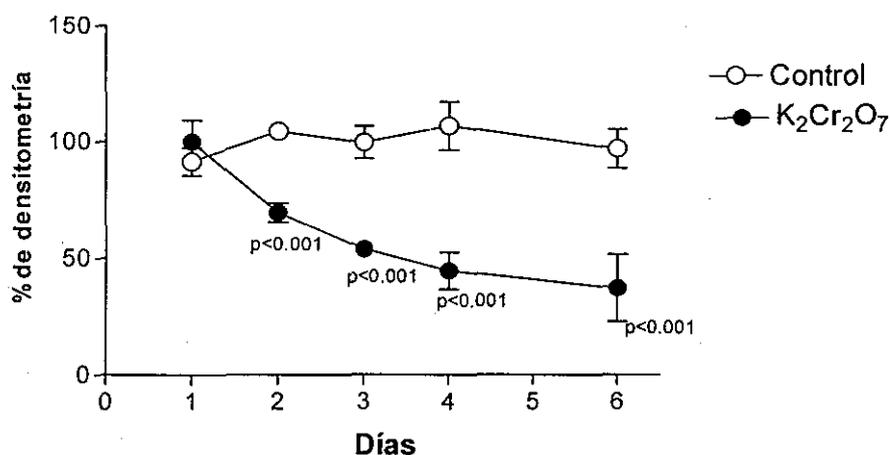


Figura 24: Análisis densitométrico del Western blot de catalasa. Cada punto es un promedio de 4 determinaciones.

Al llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico de catalasa se observó que el riñón de ratas controles muestran inmunorreactividad intensa para esta enzima, específicamente en la base de las células epiteliales que conforman los túbulos contorneados proximales (flechas) (Figura 25a). Los túbulos contorneados distales son prácticamente negativos (cabeza de flecha). Los túbulos contorneados proximales mantienen la inmunorreactividad positiva para la enzima catalasa después del primer día de la administración del tóxico, en coexistencia con manifestaciones de daño celular evidenciada por vacuolación extensa del citoplasma (Figura 25b). En los días 2 y 3 posteriores a la administración del tóxico, pocos túbulos contorneados proximales muestran inmunorreactividad para catalasa (flechas) (Figura 25c-d). En los días 4 y 6 la mayoría de los túbulos contorneados proximales se han regenerado totalmente; sin embargo, la inmunorreactividad a catalasa, en las células regenerativas, es casi nula.

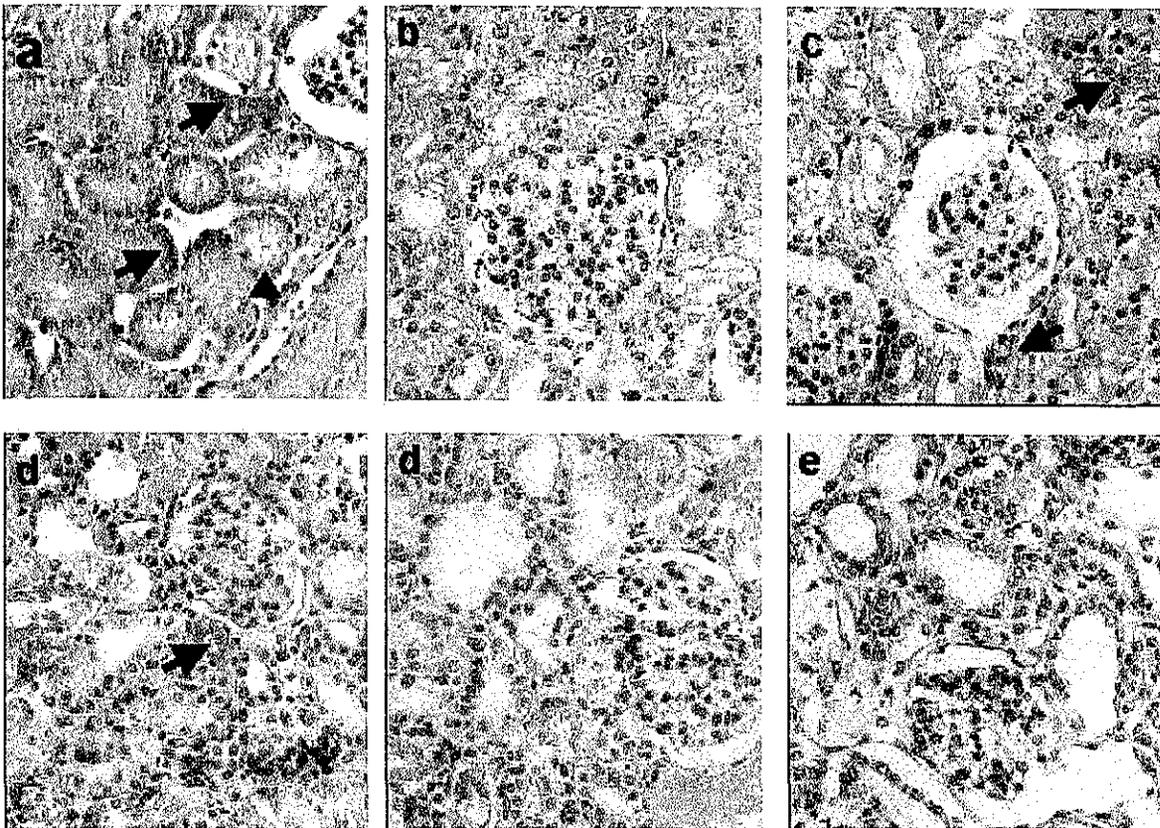
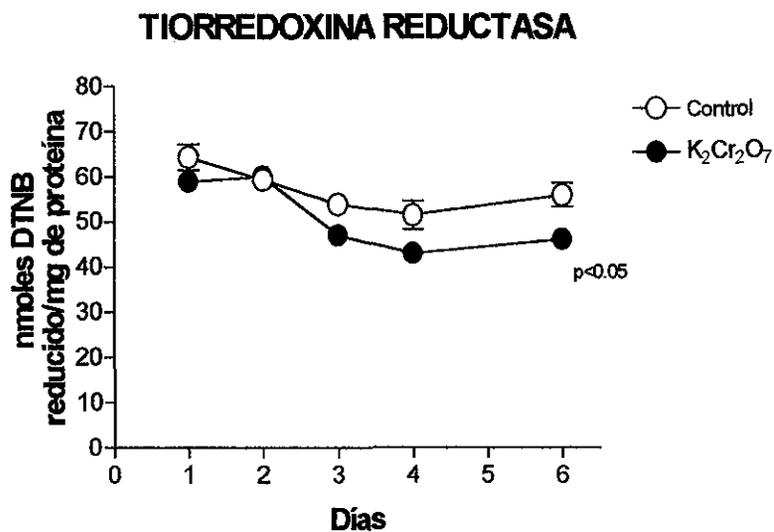


Figura 25: Inmunohistoquímica de catalasa en riñón de rata control y de ratas expuestas a dicromato de potasio 1, 2, 3, 4 y 6 días (b, c, d, e y f respectivamente).

7.4.4 Tiorredoxina reductasa.

En la figura 22 se muestra la actividad de tiorredoxina reductasa y en donde se aprecia que su actividad disminuye significativamente solo en el sexto día con respecto a su control.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 22. Actividad de tiorredoxina reductasa en corteza renal. Cada punto es un promedio de 3-5 determinaciones.

7.4.5 Peroxirredoxinas.

Finalmente, en la figura 23 se muestra la actividad de las enzimas antioxidantes peroxirredoxinas, en donde se observa que la actividad de estas enzimas no se modifica significativamente a lo largo del estudio.

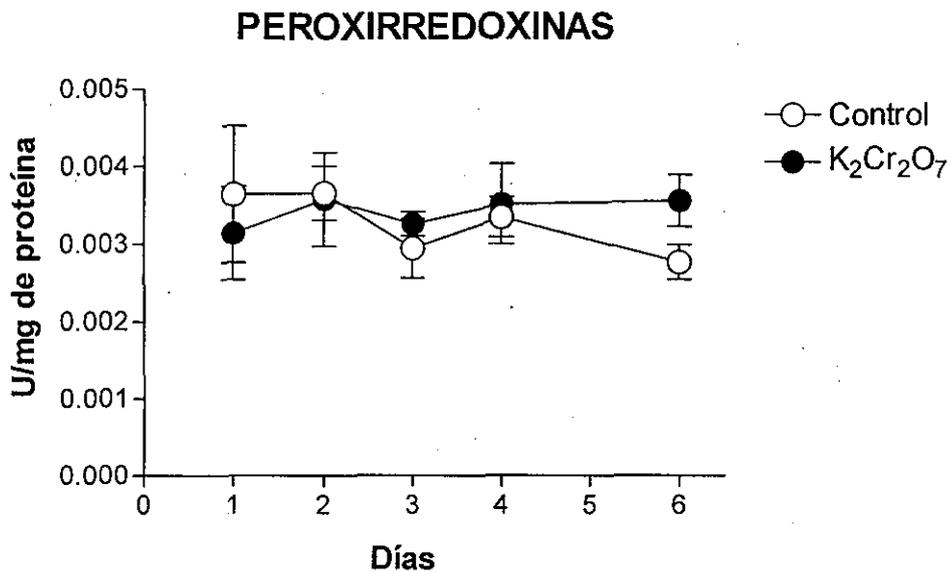


Figura 23: Actividad de peroxirredoxinas en corteza renal. Cada punto es un promedio de 3-5 determinaciones. (P= NS)

8. DISCUSIÓN

La IRA es un síndrome que se caracteriza por una disminución de la filtración glomerular. Este síndrome generalmente se debe a la NTA, el cual se caracteriza por un daño severo a las células epiteliales de los túbulos proximales, ya sea por factores como isquemia o bien por la acción nociva de nefrotoxinas. Se ha visto que estos factores promueven una disminución en la permeabilidad de los capilares glomerulares, flujo retrógrado del filtrado glomerular, obstrucción tubular y vasoconstricción intrarrenal. Tanto la isquemia como las nefrotoxinas pueden inducir necrosis y descamación de las células epiteliales de los túbulos proximales obstruyendo el lumen de los mismos. Tal obstrucción provoca un incremento de presión en la región afectada del túbulo y por consiguiente se genera un flujo retrógrado caracterizado por la salida del filtrado glomerular hacia el exterior de los túbulos, tal como ocurre en el modelo de isquemia y reperfusión (24). Es probable que esta misma situación pueda presentarse en nuestro modelo de IRA por dicromato de potasio, debido a que se logró inducir necrosis y obstrucción tubular identificada por la presencia de túbulos hialinos (Figura 10). Es importante señalar que en los primeros días de establecerse la IRA normalmente se presenta un cuadro oligúrico (73) ocasionado por la disminución en la filtración glomerular; sin embargo, en algunos casos el volumen de orina excretado no varía (140) como se observó en este estudio. En el primer y segundo día de exposición al tóxico (con obstrucción tubular notoria) el volumen de orina eliminado no varió, sin embargo, en el tercer y cuarto día (con obstrucción tubular importante y con claros procesos regenerativos) se observó un aumento significativo en el volumen de orina. Lo anterior sugiere que, en los primeros dos días del estudio el grado de obstrucción de los lúmenes tubulares no fue severo, lo que permitió una eliminación normal de orina; mientras que a partir del tercer día, probablemente por la acción de la presión hidráulica generada al interior de los túbulos se promovió la remoción de los detritus celulares lo que trajo como consecuencia un mayor flujo de orina. Por otro lado, el análisis histológico indicó que del tercer al sexto día del estudio, la mayoría de los túbulos contorneados proximales mostraron una gran actividad regenerativa, en donde se observaron células inmaduras y, a juzgar por el volumen de orina excretado por estas ratas, lo anterior sugiere que a estos tiempos del estudio las nuevas células aún no reabsorben el agua como una célula normal.

En alusión a la mayor concentración de cromo en el riñón detectada en el primer día posterior a la administración del tóxico, ésta pudiera deberse al proceso de reabsorción de las células de los túbulos contorneados proximales, ya que de acuerdo con estudios realizados (96, 143), es en este segmento de la nefrona donde se acumula, particularmente en las vacuolas de estas células (96). La

disminución de cromo detectada en el tercer y cuarto día, muy probablemente se debió a la eliminación de las células necróticas a través de la orina, ya que se ha reportado que los iones cromato, una vez que son introducidos a las células por un sistema de transporte aniónico para fosfatos y sulfatos (98, 100), el ión metálico es reducido hasta la valencia tres, el cual ya no tiene la capacidad de salir de la célula salvo en situaciones donde las células enfrentan procesos necróticos. Tomando en cuenta que en el presente estudio las células de los túbulos contorneados proximales sufrieron necrosis extensa en los primeros dos días y que a partir del tercer día se observó la eliminación de los restos necróticos, es de pensarse que junto con los detritus también se eliminó el cromo asimilado por estas células. Sin embargo, la presencia del metal en el riñón se mantuvo constante a partir del cuarto día (el cual fue prácticamente la mitad del valor alcanzado en el inicio del estudio), probablemente por la incorporación y retención del cromo en el resto del tejido renal que no presentó necrosis.

8.1 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN GLOMERULAR

El aumento en los niveles de creatinina y NUS inducido por el dicromato de potasio concuerda con trabajos anteriores (101, 105). Se sabe que el dicromato de potasio es capaz de inducir una serie de alteraciones que provocan una necrosis en las células de los túbulos proximales (110); asimismo los restos necróticos generados contribuyen a la obstrucción del flujo tubular. Lo anterior trae como consecuencia la aparición del flujo retrógrado y, por consiguiente, un aumento de la presión hidráulica en la cápsula de Bowman lo que disminuye la filtración de la sangre en los glomérulos. Todo esto trae como consecuencia que aumente la concentración de productos finales del metabolismo, incluyendo urea y creatinina. En este estudio se observó que entre el primer y segundo días las células presentaron abultamiento y aparición de un gran número de vacuolas, lo cual concuerda con estudios previos (96, 101, 105), pero además se observó rompimiento de membranas, vaciado del contenido citoplásmico y descamación de células. Esto condujo a que un gran número de túbulos presentaran obstrucción tubular (principalmente en el segundo, tercer y cuarto día), induciendo una disminución en los procesos de filtración de la sangre y por consiguiente un aumento en los niveles de urea y creatinina principalmente entre el segundo y tercer día de exposición a dicromato de potasio. En el sexto día, la insuficiencia renal disminuyó claramente evidenciada por una disminución en estos dos parámetros.

A pesar de que se ha demostrado que las ERO son capaces de provocar alteraciones en los glomérulos (142), como por ejemplo inducción de la contracción de las células mesangiales (tipo celular que intervienen en la modulación de la filtración de la sangre en los glomérulos), las imágenes obtenidas de cortes histológicos de las ratas tratadas con dicromato de potasio obtenidos en este estudio, así como en otros trabajos realizados (105), revelan que el dicromato de potasio no indujo

modificaciones en la estructura de los glomérulos. Sin embargo, no se descarta que a nivel molecular existan alteraciones en estas células que induzcan una disminución de la filtración glomerular.

8.2 EVALUACIÓN DEL DAÑO TUBULAR

Por otro lado, en este estudio se observó que el dicromato de potasio es capaz de provocar un aumento en la excreción de proteínas en la orina, alcanzando su valor más alto en el segundo día, lo que coincide con lo informado en la literatura (79, 101). Esta proteinuria se explica por el hecho de que las células dañadas (en su mayoría necróticas) del túbulo proximal pierden la capacidad de reabsorber a las proteínas que logran filtrarse a través del glomérulo. Además, las células necróticas también contribuyen con una descarga de proteínas intracelulares, las cuales se vierten al fluido tubular, como es el caso de la enzima NAG. Esto trae como consecuencia un aumento extra en la excreción de proteínas en la orina, tal como se observa en el segundo día de exposición al nefrotóxico, que fue el tiempo donde se observó el grado más alto de necrosis, de acuerdo a los datos de histología realizados, así como de actividad de la enzima NAG en la orina.

Otro parámetro analizado para evaluar el daño tubular fue la actividad de la enzima GPX plasmática, la cual es una proteína que se sintetiza principalmente en los túbulos proximales de las nefronas (75), por lo que, alteraciones graves en los túbulos proximales, como es el caso de una necrosis tubular, trae como resultado una disminución en la síntesis de esta enzima y por consiguiente una disminución de esta proteína en el plasma. Al observarse una disminución en la actividad de la enzima durante el período de estudio, se pusieron en evidencia las alteraciones en las células de túbulos proximales provocadas por la acción tóxica del dicromato de potasio (lo cual se confirma con el análisis histológico donde se muestra que un altísimo porcentaje de estas células ya presentan daño en el segundo día). Sin embargo, el análisis histológico indica que la respuesta de la nefrona no se hace esperar y en las zonas dañadas la regeneración celular comienza a llevarse a cabo de manera evidente en el tercer día, siendo muy notorio este proceso en el cuarto y sexto días (Tabla I y figura 11). Ahora bien, la baja actividad de la GPX plasmática en los últimos días del estudio pudiera tomarse como una evidencia de que las células, en el proceso de regeneración, no llevan a cabo todos los procesos metabólicos que caracterizan a una célula normal de túbulo proximal.

El aumento de productos finales del metabolismo como creatinina y urea en la sangre, así como la excreción de proteínas en la orina en los animales expuestos a dicromato de potasio, junto con las evidencias histológicas, indican claramente que las células del túbulo proximal sufrieron una necrosis extensa que condujo a la IRA.

8.3 EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La interacción de las especies reactivas de oxígeno con las estructuras celulares genera determinados productos, algunos de los cuales son tomados como indicadores de estrés oxidativo. Entre estos productos tenemos por ejemplo al malondialdehído, el cual se genera en el proceso de lipoperoxidación (144), los grupos carbonilos (145) y la formación de nitrotirosinas en el caso de la oxidación de proteínas (23). Tomando en consideración que estudios previos indican que en el proceso de reducción de los iones cromato en las células se generan especies reactivas de oxígeno (102, 107, 125, 126), así como también de peroxinitritos (129), compuestos responsables de la generación de nitrotirosinas en las proteínas, en el presente estudio se procedió a determinar el estrés oxidativo generado en este modelo de IRA mediante un estudio inmunohistoquímico, empleando para ello un anticuerpo que reconoce residuos de nitrotirosina en las proteínas. Los resultados obtenidos indicaron que, en el segundo día después de la administración del dicromato, de potasio se observó la mayor inmunotinción lo que indica que a este tiempo de tratamiento con el tóxico, el estrés oxidativo generado fue el más alto que en el resto de los tiempos estudiados. Este pico de estrés oxidativo, en el segundo día, coincide con el pico de mayor daño celular observado por histología y sugiere fuertemente que el estrés oxidativo participa en el daño celular en este modelo experimental.

8.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Al estudiarse la actividad de la SOD total en la corteza renal de ratas tratadas con dicromato de potasio, se encontró que su actividad no cambia significativamente a pesar de observarse una gran destrucción de las células de los túbulos contorneados proximales en los primeros dos días después de haberse administrado el tóxico. Es importante resaltar que los estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo para detectar a las isoformas SODCu/Zn y SODMn en la corteza renal (Figuras 14 y 15), revelaron una marcada inmunorreactividad para ambas isoenzimas en las células necrosadas y en los detritus acumulados en los lúmenes tubulares generados en los primeros días del tratamiento, también hubo una marcada inmunoreactividad en las células inmaduras del epitelio de los túbulos en regeneración de la corteza renal en los días posteriores, lo que sugiere que en la fase de regeneración del daño existe una gran actividad transcripcional para estas isoformas. La presencia de las isoenzimas en los detritus celulares sugiere que estas proteínas son relativamente resistentes a la actividad de las proteasas que se activan en todo proceso necrótico. De lo anterior, se deduce que la retención de las isoenzimas en los restos necróticos, así como su síntesis en estadios tempranos del desarrollo de las células que regeneraron las áreas dañadas de los túbulos, contribuyeron a que la cantidad y actividad de la enzima no disminuyera a lo largo del período del estudio. En el modelo de isquemia y reperfusión,

donde se ha demostrado el papel de las ERO en el daño, se han encontrado resultados diferentes a los encontrados en el presente trabajo. En dicho modelo (91, 93, 146, 147) se encontró una disminución significativa en la actividad de la SOD total en los primeros días posteriores a la isquemia y reperfusión, para después registrar una recuperación de su actividad. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios inmunohistoquímicos para detectar las isoformas de SOD en este modelo a los tiempos de 24 y 48 horas (tiempos donde se ha medido la actividad de la enzima) para determinar su ubicación en el tejido dañado. Lo anterior pudiera dar una idea de la distribución de las isoformas a estos tiempos estudiados.

En el caso de la actividad de la enzima GPX, se observó que en los días de mayor necrosis en los túbulos proximales no fue significativamente diferente a la de sus respectivos controles. Sin embargo, en los siguientes días donde se observó la regeneración de los túbulos dañados, la actividad de esta enzima disminuyó gradual pero significativamente. Lo anterior sugiere, en primer lugar, que las células sometidas al estrés oxidativo dejaron de sintetizar la enzima durante el tiempo de mayor estrés y muy probablemente con la remoción de los restos necróticos (por la acción de la presión ejercida por el fluido tubular) pudiese removerse a la enzima de la corteza renal; en segundo lugar, estos resultados sugieren que las células inmaduras no son capaces de sintetizar la enzima en cantidades suficientes para recobrar los niveles normales. El comportamiento en la actividad de la GPX encontrado en este estudio fue similar al encontrado en el modelo de isquemia reperfusión (91) en donde, además, encontraron una disminución en los niveles del ARNm, por lo que en ese modelo se piensa que la tasa de síntesis *versus* degradación de la proteína disminuye. En el presente estudio no se midieron los niveles de ARNm para esta proteína, pero tomando en consideración la necrosis extensa detectada en los primeros días, es muy probable que su síntesis también disminuya. Por otro lado, al detectar una disminución significativa a partir del segundo día de la enzima glutatión reductasa, se especula que la tasa de reducción del glutatión oxidado (GSSG) esté disminuida.

En lo que respecta a la enzima catalasa, la disminución en su actividad a lo largo del período de estudio se debió a la disminución de la proteína, determinada tanto por Western blot como por la inmunohistoquímica realizada en los cortes renales. Con el Western blot, se observó una disminución de la proteína a partir del segundo día (confirmado por el análisis densitométrico, figura 20), tiempo que se caracterizó por una mayor necrosis y acumulación de detritus en los lúmenes tubulares, por lo que la disminución en la proteína pudiera deberse a eventos proteolíticos. Por otro lado, el estudio inmunohistoquímico realizada (Figura 21) reveló que la inmunorreactividad para esta enzima desapareció conforme las células dañadas, así como los detritus alojados en los lúmenes de los túbulos contorneados proximales, fueron eliminados, lo que también pudiese contribuir a la eliminación de la

enzima del tejido renal afectado. Asimismo, se observó que en los túbulos en regeneración, las células inmaduras no presentaron inmunorreactividad para la enzima catalasa, lo que sugiere que estas células son incapaces de sintetizar a esta enzima. El comportamiento en la actividad de la catalasa observado en este estudio, también se ha visto en el modelo de IRA inducida por isquemia reperusión (80, 91, 93) en donde se han encontrado que tanto la actividad, como los niveles de la enzima y del ARNm están disminuidos.

Finalmente en lo que respecta a las familias de enzimas peroxiredoxinas (Prx), a pesar de que por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado su presencia en toda la estructura de la nefrona (71), no se han llevado a cabo estudios para determinar su comportamiento en los modelos de IRA. Los resultados obtenidos indicaron que su actividad no se modifica significativamente en los tiempos estudiados. La presencia de la proteína en las células en proliferación pudiera tener un papel importante en este proceso, ya que se ha visto que estas enzimas también participan en la regulación de señales de transducción de algunos factores como NF κ B y AP-1, los cuales intervienen en el crecimiento y proliferación celular (3, 68). La importancia de las Prx en la proliferación radica en que estas enzimas son capaces de modular la presencia de peróxido de hidrógeno intracelular, el cual se ha visto que se incrementa en células que son estimuladas por factores de crecimiento, citocinas y hormonas (3). De acuerdo con algunos autores, el peróxido de hidrógeno es capaz de estimular la proliferación celular en células de músculo liso (148), fibroblastos (149) y células endoteliales de aorta (150). Para tener una mejor visión de la actividad de las Prx, se estudió la actividad de la enzima tiorredoxina reductasa, la cual se encarga de regenerar a la tiorredoxina (proteína que regenera el estado reducido de las Prx) y se observó que su actividad tampoco se alteró significativamente a lo largo del período de estudio, con excepción del día 6. Lo anterior sugiere que la actividad de las Prx no se modifica por alteraciones en su sistema reductor.

Es importante mencionar que en nuestro modelo de IRA, la presencia de la enzima SOD pudiera tener un papel importante en la diferenciación de las células inmaduras de los túbulos proximales dañados, ya que estudios realizados *in vitro* indican que el peróxido de hidrógeno generado por esta enzima es capaz de inducir la expresión de marcadores de diferenciación como son: α -actina, calponina y miosina SM1 y SM2 en células vasculares de músculo liso (151).

Por otro lado, la disminución en la actividad de la enzima CAT pudiera contribuir a la proliferación celular de las células de los túbulos proximales, ya que se ha observado que al someter células en cultivo a una fuente generadora de peróxido de hidrógeno estas proliferan, pero al adicionar en el medio a la enzima catalasa, la proliferación cesa (150); también se ha visto en otros estudios *in*

in vitro que la adición de esta enzima en cultivos celulares se bloquea la diferenciación celular (152,153). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno puede actuar como mediador de las señales intracelulares que conllevan a la proliferación y diferenciación celular.

9. CONCLUSIONES

En el modelo de insuficiencia renal aguda inducida por dicromato de potasio:

- 1) El estrés oxidativo no promovió un aumento de la actividad y/o cantidad de las enzimas antioxidantes estudiadas.
- 2) Hay una regulación diferencial en la actividad de las enzimas antioxidantes.
- 3) No hay una asociación entre el daño estructural y funcional con la actividad de las enzimas antioxidantes.
- 4) Se requieren más estudios para conocer las bases moleculares de la regulación diferencial de las enzimas antioxidantes en la insuficiencia renal aguda inducida por dicromato de potasio.
- 5) Dado que la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y peroxirredoxinas no cambia en la etapa de regeneración, es posible que tengan un papel importante en la regeneración del daño.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

in vitro que la adición de esta enzima en cultivos celulares se bloquea la diferenciación celular (152,153). Lo anterior sugiere que el peróxido de hidrógeno puede actuar como mediador de las señales intracelulares que conllevan a la proliferación y diferenciación celular.

9. CONCLUSIONES

En el modelo de insuficiencia renal aguda inducida por dicromato de potasio:

- 1) El estrés oxidativo no promovió un aumento de la actividad y/o cantidad de las enzimas antioxidantes estudiadas.
- 2) Hay una regulación diferencial en la actividad de las enzimas antioxidantes.
- 3) No hay una asociación entre el daño estructural y funcional con la actividad de las enzimas antioxidantes.
- 4) Se requieren más estudios para conocer las bases moleculares de la regulación diferencial de las enzimas antioxidantes en la insuficiencia renal aguda inducida por dicromato de potasio.
- 5) Dado que la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y peroxirredoxinas no cambia en la etapa de regeneración, es posible que tengan un papel importante en la regeneración del daño.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Rice-Evans C.A. Formation of the free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological status. En: Free radicals and its control. Rice-Evans A.C. y Burdon R.H. (ed). Elsevier Science. 1994. USA. pp 131-135.
- 2) Forman H.J., Torres M. Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* 2001;51:365-71.
- 3) Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001;11:173-86.
- 4) Butterfield D.A, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M, Carney J. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-ter-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 1998;854:448-62.
- 5) Stadtman E.R, Berlett B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 1998;30:225-43.
- 6) Griffiths HR, Unsworth J, Blake DR, Lunec J. Free radicals in Chemistry, Pathology and Medicine. Richelieu, London, 1988. pp. 439-54.
- 7) Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-62.
- 8) Nordberg J, Arnér E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287-312.
- 9) Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4533-7.
- 10) Luo GM, Qi DH, Zheng YG, Mu Y, Yan GL, Yang TS, Shen JC. ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Lett* 2001;492:29-32.
- 11) Takano S, Aramaki Y, Tsuchiya S. Lipoxygenase may be involved in cationic liposome-induced macrophage apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:116-20.
- 12) Rieger JM, Shah AR, Gidday JM. Ischemia-Reperfusion Injury of Retinal Endothelium by Cyclooxygenase and Xanthine Oxidase-Derived Superoxide. *Exp Eye Res* 2002;74:493-501.
- 13) Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 2002;90:143-50.
- 14) Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:12365-7.
- 15) Freeman BD. Biological sites and mechanisms of free radical production. En: Free radicals molecular biology, aging, and disease. Armstrong D, Sohal RS, Cutler RG, Slater TE. (eds). Raven, New York, 1984. pp. 43-52.

- 16) Bannister JV, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 1987;22:111-80.
- 17) Corey EJ, Mehrotra MM, Khan AU. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;145:842-6.
- 18) Olinescu R, Smith T. Free radicals in medicine. Nova Science Publishers. 2002. USA. pp. 11-34.
- 19) Fong KL, McCay PB, Poyer JL. Evidence for superoxide-dependent reduction of Fe^{3+} and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation. *Chem Biol Interact* 1976;15:77-89.
- 20) Urbanski NK, Beresewicz A. Generation of $\cdot OH$ initiated by interaction of Fe^{2+} and Cu^+ with dioxygen; comparison with the Fenton chemistry. *Acta Biochim Pol* 2000;47:951-62.
- 21) Harris LR, Cake MH, Macey DJ. Iron release among ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs from vertebrates. *J Biochem* 1994;301:385-9.
- 22) Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 1994;45:1-9.
- 23) Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 3ª edición. Oxford University Press. USA. 2001. pp 36-104.
- 24) Nath K, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 2000;109:665-78.
- 25) Huberman A. Biología de los radicales de oxígeno En: Bioquímica. Díaz ZJC, Hicks GJJ (eds). Interamericana-McGraw-Hill, México DF, 1995.
- 26) Florence T.M. Free radicals, antioxidants and cancer prevention. *Proc Nutr Soc Aust Annu Conf* 1990;15:88-93.
- 27) Zentella P, Corona G, Saldaña B. Toxicidad del oxígeno: papel de los radicales libres en la peroxidación de los lípidos. *BEB* 1994;13:87-93.
- 28) Burton GW, Yoyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 1982;2:327-9.
- 29) Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: Membrane Lipid Oxidation. Vigo-Pelfrey C. (ed). Boca Raton, Fl: CRC, 1991, vol 2. pp. 151-70.
- 30) Frei B, Stocker R, England L, Ames B. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990;264:155-63.
- 31) May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by the thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1998;273:23039-45.
- 32) Buettner GR. The pecking order of the free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300:535-43.
- 33) Krinsky NI, Deneke SM. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J Natl Cancer Inst* 1982;69:205-209.

- 34) Hamdi IÖ, Balk M, Aksoy Y, Müftüoğlu M, Özer N. The effects of oxidative stress on the redox system of the human erythrocyte. En: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. Özben T. (ed). Plenum press. USA. 1998. pp. 25-49.
- 35) Gibson DD, Hawrylko J, McCay BP. GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids* 1985;20:704-11.
- 36) Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986;235:747-54.
- 37) Sevanian A, Davies KJ, Hochstein P. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J Free Radic Biol Med* 1985;1:117-24.
- 38) Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985;240:500-8.
- 39) Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248:4793-6.
- 40) Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:7634-8.
- 41) Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 1996;75:617-36.
- 42) Murphy LM, Strange RW, Hasnain SS. A critical assesment of the evidence from XAFS and crystallography for the breakage of the imidazolate bridge during catalysis in CuZn superoxide dismutasa. *Structure* 1997;5:371-9.
- 43) Banci L, Benedetto M, Bertini I, Del Conte R, Piccioli M, Viezzoli MS. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* 1998;37:11780-91.
- 44) Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998;201:1203-09.
- 45) Hsieh Y, Tu C, Bratt PJ, Angerhofer A, Lepock JR, Hickey MJ, Tainer JA, Nick HS, Silverman DN. Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143. *Biochemistry* 1998;37:4731-9.
- 46) Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975;44:147-59.
- 47) Gregory EM, Fridovich I. Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *J Bacteriol* 1973;114:543-8.
- 48) Cheng L, Kellogg EW 3rd, Packer L. Photoinactivation of catalase. *Photochem Photobiol* 1981;34:125-9.
- 49) Aebi HE. Catalase, En: Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weimheim, 1982.
- 50) Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:13-8.
- 51) Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31:261-72.

- 52) Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 2000;296:295-309.
- 53) Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:4343-7.
- 54) Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanism of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 1999;274:13908-14.
- 55) Burk RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 1991;5:2274-9.
- 56) Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys* 1994;309:239-46.
- 57) Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994;266:C365-7.
- 58) Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993;268:2571-6.
- 59) Brigelius-Flohe R, Auman KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and reduced amino acid sequence. *J Biol Chem* 1994;269:7342-8.
- 60) Ren B, Huang W, Akesson B, Ladenstein R. The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol* 1997;268:869-85.
- 61) Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992;6:2675-83.
- 62) Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:101-12.
- 63) Chae HZ, Kang SW, Rhee SG. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 1999;300:219-26.
- 64) Hirotsu S, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, Hakoshima T. Crystal structure of multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:12333-8.
- 65) Lee SP, Hwang YS, Kim YJ, Kwon KS, Kim HJ, Kim K, Chae HZ. Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J Biol Chem* 2001;276:29826-32.
- 66) Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 1998;273:6297-302.
- 67) Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000;346:1-8.
- 68) Butterfield LH, Merino A, Golub SH, Shau H. From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 1999;1:385-402.

- 69) Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HW, Lin MC, Fung PC, Kung H, Jin DY. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:921-7.
- 70) Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Kang SW, Rhee SG, Soini Y. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002;196:316-23.
- 71) Oberley TD, Verwiebe E, Zhong W, Kang SW, Rhee SG. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic Biol Med* 2001;30:412-24.
- 72) Heinz VMD. Renal Function: Mechanism Preserving Fluid and Solute Balance in Health. 2nd edition. Little, Brown and Company. USA. 1983. pp. 1-10.
- 73) Brenner BM. The kidney. W.B. Saunders Company. 6^a edición. 2000. USA.
- 74) Welling LW, Welling DJ. Surface areas of brush border and lateral cell walls in the rabbit proximal nephron. *Kidney Int* 1975;8:343-8.
- 75) Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Misoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem* 1991;109:918-23.
- 76) Sánchez L. Insuficiencia renal aguda. Aspectos clínicos. En: Tratado de nefrología. Martínez M, Rodicio J, Herrera J. (ed). Ediciones Norma. 2^a edición. Madrid. 1993. pp. 548-588.
- 77) Agrawal M, Swartz R. Acute renal failure. *Am Fam Physician* 2001;63:445-50.
- 78) Dishart MK, Kellum JA. An evaluation of pharmacological strategies for the prevention and treatment of acute renal failure. *Drugs* 2000;59:79-91.
- 79) Wedeen RP, Qian L. Chromium-induced kidney disease. *Environ Health Perspect* 1991;92:71-4.
- 80) Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 1993;49:621-9.
- 81) Rovin BH, Wurst E, Kohan DE. Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int* 1990;37:1509-14.
- 82) Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, Thiemermann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 2000;58:658-73.
- 83) Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 1986;251:F765-76.
- 84) Hughes AK, Stricklett PK, Padilla E, Kohan DE. Effect of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells. *Kidney Int* 1996;49:181-9.
- 85) Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 1999;31:971-97.
- 86) Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A. Depression of membrane-bound Na⁺-K⁺-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol* 1988;254:C330-7.

- 87) Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, Simone J, Goligorsky MS. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol* 1993;264:F149-57.
- 88) Clough D, Bunger R. Protection by pyruvate against inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase by a free radical generating system containing t-butylhydroperoxide. *Life Sci* 1995;57:931-43.
- 89) Appenroth D, Schulz O, Winnefeld K. Rivoflavin can decrease the nephrotoxic effect of chromate in young and adult rats. *Toxicol Lett* 1996;87:47-52.
- 90) Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi I, Granados-Silvestre MA, Hernandez-Pando R, Ibarra-Rubio ME. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 2000;29:602-11.
- 91) Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* 2000;205:1-11.
- 92) Yuceyar S, Gumustas K, Erturk S, Hamzaoglu IH, Uygun N, Ayaz M, Cengiz A, Kafadar Y. The role of oxygen free radicals in acute renal failure complicating obstructive jaundice: an experimental study. *HPB Surg* 1998;10:387-93.
- 93) Singh I, Gulati S, Orak JK, Singh AK. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1993;125:97-104.
- 94) Ozbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B, Ozbek M. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int* 2000;85:742-6.
- 95) Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2683-90.
- 96) Berry JP, Hourdry J, Galle P, Lagrue G. Chromium concentration by proximal renal tubule cells: an ultrastructural, microanalytical and cytochemical study. *J Histochem Cytochem* 1978;26:651-7.
- 97) Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the elements. Pergamon Press. USA. 1984.
- 98) Jennette KW. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. *Environ Health Perspect* 1981;40:233-252.
- 99) De Flora S, Wetterhahn KE. Mechanism of chromium (VI) metabolism and genotoxicity. *Life Chem Rep* 1989;7:169-244.
- 100) Dartsch PC, Hildenbrand S, Kimmel R, Schmahl FW. Investigations on the nephrotoxicity and hepatotoxicity of trivalent and hexavalent chromium compounds. *Int Arch Occup Environ Health* 1998;71:S40-5.
- 101) Franchini I, Mutti A, Cavatorta A, Corradi A, Cosi A, Olivetti G, Borghetti A. Nephrotoxicity of chromium. Remarks on an experimental and epidemiological investigation. *Contrib Nephrol* 1978;10:98-110.
- 102) Liu KJ, Shi X. *In vivo* reduction of Chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 2001;222:41-7.
- 103) Tandon SK, Behari JR, Kachru DN. Distribution of chromium in poisoned rats. *Toxicology* 1979;13:29-34.
- 104) Ellis EN, Brouhard BH, Lynch RE, Dawson EB, Tisdell R, Nichols MM, Ramirez F. Effects of hemodialysis and dimercaprol in acute dichromate poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 1982;19:249-58.

- 105) Pedraza-Chaverrí J, Moreno-Muñiz SI, Cruz C, Hernández-Pando R, Larriva-Sahd J, Tapia E. Urinary Angiotensin I-converting enzyme activity is increased in experimental acute renal failure. *Clin Invest Med* 1995;18:424-34.
- 106) De Tata V, Bombara M, Novelli M, Pingitore R, Bergamini E. Glycated plasma proteins in experimentally induced acute toxic renal failure by dichromate injection: evidence for loss with urine and decreased plasma levels. *Int J Exp Pathol* 1998;79:141-9.
- 107) Sugiyama M. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 1992;12:397-407.
- 108) Miyajira H, Hewitt WR, Cote MG, Plaa GL. Relationships between histological and functional indices of acute chemically induced nephrotoxicity. *Fundam Appl Toxicol* 1983;3:543-51.
- 109) Gumbleton M, Nicholls PJ. Dose-response and time-response biochemical and histological study of potassium dichromate-induced nephrotoxicity in the rat. *Food Chem Toxicol* 1988;26:37-44.
- 110) Sharma BK, Singhal PC, Chugh KS. Intravascular haemolysis and acute renal failure following potassium dichromate poisoning. *Postgrad Med J* 1978;54:414-5.
- 111) Standeven AM, Wetterhahn KE. Chromium (VI) toxicity: uptake, reduction and DNA damage. *J Am Coll Toxicol* 1989;8:1275-83.
- 112) Bagchi D, Hassoun EA, Bagchi M, Stohs SJ. Chromium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, nitric oxide production, and generation of reactive oxygen species in Sprague-Dawley rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1995;110C:177-87.
- 113) Goyer RA. Environmentally related diseases of the urinary tract. *Med Clin North Am* 1990;74:377-389.
- 114) Hojo Y, Satomi Y. *In vitro* nephrotoxicity induced in mice by chromium (VI): Involvement of glutathione and chromium (V). *Biol Trace Elem Res* 1991;31:21-31.
- 115) Laborda R, Diaz-Mayans J, Núñez A. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of chromium compounds in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1986;36:332-6.
- 116) Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Ueda J, Sugiyama M. Potent protective effect of melatonin on chromium (VI)-induced DNA single-strand breaks, cytotoxicity, and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144:377-84.
- 117) Chorvatovicova D, Ginter E, Kosinova A, Zloch Z. Effect of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and guinea pig. *Mutat Res* 1991;262:41-6.
- 118) Bradberry SM, Vale JA. Therapeutic review: is ascorbic acid of value in chromium poisoning and chromium dermatitis? *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37:195-200.
- 119) Shi X, Dalal NS. Chromium (V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium (VI). *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:627-34.
- 120) Xie Y, Zhuang ZX. Chromium (VI)-induced production of reactive oxygen species, change of plasma membrane potential and dissipation of mitochondria membrane potential in Chinese hamster lung cell cultures. *Biomed Environ Sci*. 2001;14:199-206.

- 121) Appenroth D, Rost M, Friedrich M, Schulz O. Contribution to the mechanism of chromate nephrotoxicity in developing rats: EPR investigations. *Arch Toxicol* 1996;71:25-30.
- 122) O'Brien P, Barrett J, Swanson F. Chromium (V) can be generated in the reduction of chromium (VI) By glutathione. *Inorg Chim Acta* 1985;108:19-20.
- 123) Pourahmad J, O'Brien PJ. Biological reactive intermediates that mediates chromium (VI) toxicity. *Adv Exp Med Biol.* 2001;500:203-7.
- 124) O'Brien P, Kortenkamp A. Chemical models important in understanding the way in which chromate can damage DNA. *Environ Health Perspect* 1994;102:3-10.
- 125) Jones P, Kortenkamp A, O'Brien P, Wang G, Yang G. Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium (V) intermediate isolated from the reaction of chromate with glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1991;286:652-5.
- 126) Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: Reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chem Res Toxicol* 1990;3:595-603.
- 127) Kawanishi S, Inoue S, Sano S. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1986;261:5952-8.
- 128) Sugden KD, Stearns DM. The role of chromium (V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000;19:215-30.
- 129) Wang S, Shi X. Molecular mechanism of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 2001;222:3-9.
- 130) Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human diseases. *Am J Med* 1991;91:14S-22S.
- 131) Hynder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1991;126:104-5.
- 132) Evan AP, Dail WG. The effects of sodium chromate on the proximal tubules of the rat kidney. Fine structural damage and lysozymuria. *Lab Invest* 1974;30:704-15.
- 133) Kirschbaum BB, Sprinkel FM, Oken DE. Proximal tubule brush border alterations during the course of chromate nephropathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;58:19-30.
- 134) Sengupta T, Chattopadhyay D, Ghosh N, Maulik G, Chatterjee GC. Impact of chromium on lipoperoxidative processes and subsequent operation of the glutathione cycle in rat renal system. *Indian J Biochem Biophys* 1992;29:287-90.
- 135) Jung K, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. Methods compared for determining activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme* 1991;45:215-21.
- 136) Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 1984;105:457-64.
- 137) Paglia D, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.

- 138) Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975;250:5475-80.
- 139) Hill KE, McCollum GW, Burk RF. Determination of thioredoxin reductase activity in rat liver supernatant. *Anal Biochem* 1997;253:123-5.
- 140) Haller M, Schelling G. Acute kidney failure. Physiopathology--clinical diagnosis--therapy. *Anaesthesist* 2000;49:349-52.
- 141) Davison IWF, Burt RL, Parker JC. Renal excretion of trace elements chromium and copper. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;147:720-5.
- 142) Duque I, García-Escribano C, Rodriguez Puyol M, Diez-Marqués ML, Lopez-Novoa JM, Arribas I, Hernando L, Rodríguez Puyol D. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 1992;263:F466-73.
- 143) Ruegg HE, Gandolfi AJ, Nagle RB, Brendel K. Differential patterns of injury to the proximal tubule of renal cortical slices following *in vitro* exposure to mercury chloride, potassium dichromate, or hypoxic conditions. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;90:261-73.
- 144) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
- 145) Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AC, Ahn B-W, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-78.
- 146) Uysal F, Girgin FK, Tuzun S, Aldemir S, Sozmen EY. Effect of vitamin E on antioxidant enzymes and nitric oxide in ischemia-reperfused kidney injury. *Biochem Mol Biol Int* 1998;44:1255-63.
- 147) Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on antioxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995;3:348-54.
- 148) Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992;70:593-9.
- 149) Burdon RH, Rice-Evans C. Free radicals and the regulation of the mammalian cell proliferation. *Free Radic Res Commun* 1989;6:345-58.
- 150) Ruiz-Gines JA, Lopez-Ongil S, Gonzalez-Rubio M, Gonzalez-Santiago L, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:109-13.
- 151) Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani MA, Clark KR, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circ Res* 2001;89:39-46.
- 152) Susukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K, Crystal R, Kamata T. Nerve Growth factor-induced neural differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2000;275:13175-8.
- 153) Ha HC, Thiagalingam A, Nelkin BD, Casero RA Jr. Reactive oxygen species are critical for the growth and differentiation of medullary thyroid carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:3783-7.